

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

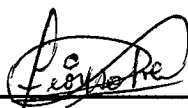


**“EXPRESIÓN DEL GEN FORTILIN DE LANGOSTINO BLANCO
Litopenaeus vannamei POST - INDUCCIÓN CON
LIPOPOLISACÁRIDOS DE E. coli”**


**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO**

BR. FIORELLA LIZBETH SOLIMANO NEGRÓN

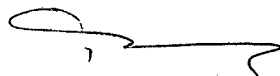
**PIURA - PERÚ
2014**



Br. FIORELLA LIZBETH SOLIMANO NEGRÓN
AUTOR



Blg. CÉSAR TORRES DÍAZ MSc.
ASESOR



Blg. RONALD MARCIAL RAMOS M. Sc.
PRESIDENTE



Blg. WILDER RODRÍGUEZ ARTEAGA M. Sc.
SECRETARIO



Mtblg. JAIME FERNÁNDEZ PONCE
VOCAL

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y MÉTODOS	27
1. ACLIMATACIÓN Y AGRUPACIÓN.....	27
2. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	27
3. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO.....	28
4. DISEÑO DE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA FORTILIN.....	29
5. ANÁLISIS DE SECUENCIAS AMPLIFICADAS.....	29
6. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN.....	31
 RESULTADOS	 35
3.1 ESPECIFICIDAD SOBRE EL GEN FORTILIN DE <i>Litopenaeus</i> <i>vannamei</i>	 35
3.2 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FORTILIN POR REAL TIME-PCR.....	 36
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Secuencias genómicas de fortilin de especies relacionadas.....	29
TABLA 2: Condiciones de amplificación del gen fortilin por PCR.....	30
TABLA 3: Condiciones de amplificación del gen fortilin por Real Time-PCR (qPCR).....	32
TABLA 4: Niveles de expresión temporal del gen fortilin en función a EFA con diferentes tratamientos	35
TABLA 5: Expresión sin inducción de fortilin en función del tiempo	65
TABLA 6: Expresión con Solución Salina de fortilin en función del tiempo ...	66
TABLA 7: Expresión con inducción de LPS de <i>E. coli</i> de fortilin en función del tiempo.....	67
TABLA 8: Expresión de EFA sin inducción en función del tiempo.....	68
TABLA 9: Expresión de EFA post inducción con Solución Salina en función del tiempo	69
TABLA 10: Expresión de EFA post inducción con Lipopolisacáridos de <i>E. coli</i> en función del tiempo.....	70
TABLA 11: Concentraciones logarítmicas de EFA empleadas para calibración de la curva estándar	71
TABLA 12: Niveles de expresión en los diferentes tratamientos	76
TABLA 13: Análisis de varianza ANOVA de la razón de expresión de fortilin.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Especificidad de primers sobre el gen fortilin	34
Figura 2: Niveles de expresión temporal de fortilin en función a EFA bajo diferentes tratamientos de inducción	36
Figura 3: Niveles de expresión temporal de fortilin en función a EFA bajo tratamiento de inducción con LPS en relación a los Controles: sin inyección e inyectados con solución salina	37
Figura 4: Felograma de las secuencias FORWARD (arriba) y REVERSE (abajo) del producto amplificado.....	63
Figura 5: Comparación de la secuencia consenso con la base de datos GeneBank.....	64
Figura 6: Curva estándar de EFA (gen de referencia).....	71
Figura 7: Curva de melting de los productos de EFA	72
Figura 8: Programa de amplificación LightCycler 480	73
Figura 9: Curva de melting de los productos de fortilin.....	74
Figura 10: Curvas de amplificación de productos de fortilin por qPCR.....	75

RESUMEN

Las enfermedades en langostinos han limitado su producción en el campo de la acuicultura, otorgando mayor valor científico a los estudios relacionados al sistema inmune de estas especies.

Se investigó la expresión temporal del gen fortilin, a fin de conocer su relación en la respuesta inmune en el langostino blanco *Litopenaeus vannamei* frente al lipopolisacárido de *E. coli*. Los resultados mostraron baja expresión durante las 3 y 6 primeras horas seguida del incremento de la misma hasta las 9 y 12 horas posteriores a la inducción donde alcanzó su mayor expresión, llegando a disminuir a las 24 y 48 horas siguientes. Dichos resultados sustentan la importancia del gen fortilin en la respuesta inmune de esta especie.

Palabras claves: Cuantificación relativa, PCR en tiempo real, fortilin, lipopolisacárido, sistema inmune, hemocitos, *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

Diseases in shrimp have limited their production in the field of aquaculture, providing greater value to scientific studies related to the immune system of these species.

It was investigated the temporal expression of fortilin gene, in order to understand their relationship in the immune response in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* against lipopolysaccharide of *E. coli*. The results showed low expression during the first 3 to 6 hours followed the same increase to 9 and 12 hours after induction which reached a high point, reaching decrease at 24 and 48 hours. These results support the importance of fortilin gene in the immune response of this species.

Keywords: Relative quantitation, real time PCR, fortilin, lipopolysaccharide, immune system, haemocytes, *Litopenaeus vannamei*.

INTRODUCCIÓN

Los crustáceos pertenecen a un antiguo y exitoso grupo zoológico, constituido por más de 40 mil especies, muchas de las cuales son muy apreciadas para consumo humano, como son los camarones, langostas, langostas de agua dulce, cangrejos y jaibas. El cultivo de crustáceos, principalmente de camarones (camaronicultura), sobresale en este contexto como una importante alternativa para la producción rápida y en gran escala de alimento para consumo humano, contribuyendo además con la protección de las poblaciones naturales de una excesiva extracción (Barraco y Perazzolo, 2008). La producción acuícola mundial de crustáceos en el 2010 consistía en especies de agua dulce (29,4 %) y especies marinas (70,6 %). En la producción de especies marinas predomina el camarón patiblanco (*Penaeus vannamei*), que incluye una producción considerable en agua dulce (FAO, 2012). En el 2011 la producción de la maricultura a nivel mundial fue de 68 600 TM (52 200 TM de la concha de abanico y 16 300 del langostino) (FAO, 2012). Económicamente, los langostinos son una de las especies más importantes en la acuicultura debido a su alta demanda alrededor del mundo (Somboonwivat *et al.*, 2010). En el Perú, las exportaciones de productos acuícolas alcanzaron durante el año 2011 los US \$ 238 5 millones, destacándose como el producto con mayor participación

las conchas de abanico (57%), seguidas de los langostinos (38%) y las truchas (4%) (PROMPERÚ, 2012).

La especie *Litopenaeus vannamei*, conocida como “langostino blanco” se distribuye en las costas occidentales de América (Océano Pacífico), desde México hasta el norte del Perú. El langostino blanco se caracteriza por su capacidad de crecer en confinamiento en altas densidades y reproducirse en cautiverio. Esta última característica es muy importante en la acuicultura porque permite cerrar el ciclo biológico, permitiendo la programación de los cultivos, al asegurarse el abastecimiento seguro de la semilla, así como la domesticación para la obtención de familias mejor adaptadas a la producción acuícola (crecimiento, tolerancia a enfermedades, adaptación a distintos ambientes, entre otros) (PRODUCE, 2007). La actividad acuícola en el Perú está circunscrita al litoral del departamento de Tumbes (03° 30' LS), fronterizo con Ecuador, tanto en terrenos eriazos de naturaleza (mayoritariamente) arenosa como en áreas próximas al ecosistema de manglares. La producción obtenida en el cultivo de langostinos ha venido incrementándose lentamente desde sus inicios; sin embargo, se vió afectada notablemente en los años 1983 y 1998 como consecuencia de los efectos negativos del fenómeno El Niño y desde el último trimestre de 1999 por la presencia de la patología viral de la “mancha blanca” (WSSV) (Yépez, 2002). El principal factor limitante para el éxito de la camaronicultura mundial, consiste actualmente en el control de las infecciones, principalmente las de

origen viral. Las altas densidades poblacionales usualmente utilizadas en los cultivos, propician la rápida propagación de los agentes infecciosos, resultando generalmente en mortalidades masivas ocasionando perjuicios económicos incalculables (Barraco y Perazzolo, 2008). Actualmente, la profilaxis y el control de las enfermedades en los cultivos se circunscriben básicamente a la práctica adecuada del manejo y la disminución de las condiciones de estrés, los factores que determinan el estado de salud de los camarones, todavía son muy poco conocidos. En este sentido, el estudio del sistema inmunológico de los crustáceos resalta en su función, permitiendo conocer las bases de la susceptibilidad y resistencia a patógenos, así como al establecimiento de los parámetros de salud e inmunomarcadores para la selección genética (Barraco y Perazzolo, 2008). La primera línea de defensa en los crustáceos es la cutícula, la cual constituye una barrera física y biológicamente activa. Un componente esencial de la inmunidad es el estado de alerta por el cual un organismo puede detectar moléculas extrañas o no propias. Un buen sistema de reconocimiento de lo "no propio debería estimular las respuestas de defensa". Los mecanismos de defensa innata están basados en componentes celulares y humorales del sistema circulatorio, lo que está interrelacionado con la detección y eliminación de patógenos extraños, microorganismos y parásitos, que evidencien un peligro potencial para el hospedero (Soderhall y Cerenius, 1992). Los crustáceos y todos los artrópodos no poseen un sistema inmunitario adaptativo basado en la especificidad y la memoria; es decir, no poseen inmunoglobulinas como en

el caso de los vertebrados que reconozcan epitopes específicos. Sin embargo, son capaces de reconocer y destruir microorganismos invasores y parásitos por medio de mecanismos inmunitarios celulares y humorales que operan para mantener la integridad del organismo. El hemocele de los crustáceos tiene circulación abierta y las células sanguíneas que se encuentran en este sistema (hemocitos) son análogas a los glóbulos blancos de los vertebrados (Soderhall y Smith, 1983; Soderhall y Cerenius, 1992). Los principales sistemas de defensa actualmente reconocidos en los crustáceos son: 1) Coagulación de la hemolinfa; 2) Melanización mediada por el sistema profenoloxidasa (proPO); 3) Reconocimiento y aglutinación celular mediado por lectinas; 4) Sistemas antibacterianos, RNA de interferencia y proteínas de reconocimiento patrón; 5) Producción de formas reactivas de oxígeno y nitrógeno; y, 6) Sistema fagocítico y de encapsulamiento (Barraco y Perazzolo, 2008).

Las respuestas inmunocelulares de los crustáceos como fagocitosis de microorganismos, formación de cápsulas y nódulos en torno a los invasores y los mecanismos citotóxicos o degradativos intracelulares usados para degradar y eliminar los patógenos ocurre en los hemocitos; los que se clasifican en hemocitos hialinos (HHs), hemocitos semigranulares o con gránulos pequeños (HPGs) y hemocitos granulares o con gránulos grandes (HGGs) (Bauchau, 1981; Hose *et al.*, 1990; Johansson *et al.*, 2000). La activación de los hemocitos resulta generalmente en su dilatación y

degranulación ocurriendo la liberación de efectores inmunológicos para el plasma. Los hemocitos hialinos están relacionados con el mecanismo de coagulación y son consideradas principales células fagocitarias. Los hemocitos granulares están relacionados con la fagocitosis de microorganismos, formación de cápsulas y nódulos y la producción de moléculas tóxicas y microbicidas. En langostinos y cangrejos la HPGs actúan en la encapsulación; los HGGs en almacenamiento de moléculas inmunoefectoras y los HHs en la fagocitosis de microorganismos (Johansson *et al.*, 2000).

En el proceso de fagocitosis, el agente extraño es envuelto e interiorizado dentro de un fagosoma, que luego se funde con los gránulos presentes en el citoplasma. Una vez unidas las dos estructuras, una variedad de compuestos degradativos y antimicrobianos son liberados en las vacuolas fagocíticas, fagolisosomas, llevando a la degradación de las partículas endocitadas; la fagocitosis constituye la primera línea de defensa celular contra la invasión de microorganismos (Martin *et al.*, 1996). Cuando la cavidad corporal de los crustáceos es invadida por una cantidad masiva de microorganismos o por patógenos de gran tamaño, cuya fagocitosis no es posible, se desencadena entonces la formación de nódulos y cápsulas celulares, respectivamente. La formación de cápsulas se caracteriza por la agregación de varias capas de hemocitos alrededor del patógeno de gran tamaño, como hifas de hongos, nematodos y determinadas formas de protozoarios, promoviendo que sea

atrapado en los tejidos del hospedero, para su posterior destrucción. La formación de nódulos, por otro lado, ocurre alrededor de una gran cantidad de microorganismos invasores, que también son capturados dentro de agregaciones celulares, semejantes a las cápsulas. Esta reacción evita su diseminación y la producción de una septicemia. Ambas reacciones, la de encapsulamiento y la formación de nódulos, no solamente llevan a la captura de los patógenos, sino también limitan las respuestas inmunológicas solamente a la región invadida. Esta respuesta inmune localizada durante las reacciones inmunológicas, ayuda a proteger los tejidos del hospedero de los daños causados por moléculas tóxicas y degradativas producidas en el proceso inflamatorio (Cerenius y Söderhäll, 2004). Debido a la fagocitosis, puede ocurrir la liberación del contenido enzimático de los lisosomas hacia el plasma, a partir de la degranulación de los hemocitos granulares. Entre las enzimas liberadas se destaca la lisozima, capaz de romper polisacáridos complejos o peptidoglicanos (PGs) de las paredes bacterianas por hidrólisis. Además de la destrucción de los microorganismos invasores por las enzimas lisosomales, durante las reacciones inmunocelulares, en especial en la fagocitosis, se observa, la producción y liberación de moléculas altamente tóxicas, que auxilian en la muerte y degradación del agente invasor. En ese momento, ocurre un importante aumento en el consumo de oxígeno a nivel intracelular, llamado choque respiratorio, que resulta en la producción de una variedad de radicales intermediarios altamente reactivos, tanto de oxígeno (en inglés *RO/s*) como de nitrógeno (en inglés *RN/s*) (Anderson, 1996; Roch,

1999 y Bogdan *et al.*, 2000). Los ROIs son radicales de oxígeno que poseen electrones libres o no pareados en su órbita más externa, lo que les confiere una elevada capacidad de reaccionar con las estructuras y compuestos próximos, tales como las membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos (ADN). Siendo así, funcionan como agentes microbicidas potentes, destruyendo o inhibiendo el crecimiento de los microorganismos invasores (Anderson, 1996; Bogdan *et al.*, 2000). La producción de esos radicales está ligada a la activación de un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa, localizada en la membrana celular y la superficie de los gránulos lisosomales. Este complejo es activado por componentes microbianos, tales como los lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas de bacterias y β -glucanos de hongos (Bogdan *et al.*, 2000). La activación de la NADPH resulta en la reducción del oxígeno molecular al anión superóxido (O_2^-), que puede convertirse, espontáneamente o a través de la enzima intracelular superóxido dismutasa (SOD), en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 es un compuesto igualmente tóxico y, si no es destruido por la catalasa del peroxisoma, puede difundirse y llegar al medio extracelular (Warner, 1994). El O_2^- puede también ser convertido en otros componentes citotóxicos, por la reacción de Haber-Weiss genera radicales hidroxilo ($-OH$) que ocurre a consecuencia de una posible fuente de estrés oxidativo, o, en ácido hipocloroso (HOCl), oxígeno singlet (1O_2) y en cloraminas por la acción de la mieloperoxidasa (MOP) (Bogdan *et al.*, 2000). Además de los radicales intermediarios de oxígeno ROIs, ocurre también la producción intracelular de

especies reactivas de nitrógeno (RNIs), como el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito (ONOO⁻), compuestos altamente citotóxicos y microbicidas (Kröncke *et al.*, 1997). El peroxinitrito es resultante de la reacción entre el NO con el anión superóxido (Anderson, 1996; Murphy *et al.*, 1998). Es importante resaltar que la producción de estas moléculas altamente tóxicas, importantes en la destrucción de los patógenos invasores, puede también provocar graves daños a los tejidos del hospedero. Para evitar esta autoagresión, el hospedero cuenta básicamente con tres mecanismos de protección o defensa antioxidantes. Los primeros dos mecanismos son endógenos e incluyen la presencia de enzimas intracelulares, como las enzimas antioxidantes: Superoxido dismutasa (SOD), catalasa y la glutatión peroxidasa, capaces de degradar a las ROIs y también las enzimas de reparación que pueden restablecer los daños provocados por los intermediarios reactivos del oxígeno (ROIs) en el DNA, membranas y proteínas del hospedero (Warner, 1994). El tercer mecanismo comprende la acción de compuestos antioxidantes de origen exógeno, como el ácido ascórbico (vitamina C), la glutatión y el α -tocoferol (vitamina E), que pueden interactuar directamente con los radicales libres neutralizándolos o interactuando directamente con los radicales libres (Warner, 1994). Por otro lado, la producción de RNIs tiene origen en la enzima óxido nítrico sintasa (en inglés, NOS), presente en el citoplasma de varios tejidos animales, incluyendo las células del sistema inmunológico. En estas últimas, la NOS es inducida por situaciones de estrés (iNOS, en inglés inducible nitric oxide

synthase) y produce NO y en seguida el peroxinitrito (ONOO-), ambos compuestos altamente tóxicos. En los otros tejidos, la NOS es expresada de forma constitutiva.

Las proteínas y péptidos antimicrobianos o AMPs (en inglés, *antimicrobial proteins/peptides*) son componentes esenciales del sistema inmune innato, pudiendo presentar una actividad microbicida rápida y potente contra un amplio espectro de microorganismos. En los crustáceos, que no cuentan con un sistema inmune adaptativo como el de los vertebrados, la presencia de AMPs en la hemolinfa asume una gran importancia para el control y prevención de infecciones por microorganismos. Los AMPs, Son moléculas relativamente pequeñas, con menos de 150-200 residuos de aminoácidos. La gran mayoría de los AMPs se destacan por sus características anfipáticas, catiónica y una región hidrofóbica, lo que facilita su interacción e inserción en los fosfolípidos aniónicos presentes en la cara externa de las membranas de muchos microorganismos (Bulet *et al.*, 2004). Los AMPs son sintetizados constitutivamente en los hemocitos y almacenados en sus gránulos (Bachère *et al.*, 2004). Tienen una actividad inhibitoria rápida y potente contra un amplio espectro de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos filamentosos, levaduras y en algunos casos también contra virus y protozoarios (Bachère *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2004). El mecanismo de acción de los AMPs se manifiesta generalmente a nivel de la membrana del microorganismo, provocando su desestabilización. Presentan en general una actividad detergente, a través de la interacción electrostática con los

fosfolípidos aniónicos de la membrana, llevando a un desequilibrio de sus funciones. También pueden insertarse en la bicapa lipídica, formando grandes poros de control de solutos y extravasación del contenido citoplasmático, resultando en la muerte del microorganismo. Otras clases de AMPs pueden ser interiorizadas e interferir con diferentes vías metabólicas esenciales al ciclo de vida de los microorganismos (Bulet *et al.*, 2004; Toke, 2005). En camarones penaeidos, tres familias de AMPs fueron descritas y caracterizadas a partir de los hemocitos: peneidinas, crustinas y factores anti-lipopolisacáridos (ALFs) (Gross *et al.*, 2001; Supungul *et al.*, 2002).

Las proteínas de reconocimiento patrón o PRPs (en inglés, *pattern-recognition proteins*), hace alusión al hecho de que el sistema inmunológico reconoce primariamente patrones moleculares presentes específicamente en los microorganismos o PAMPs (en inglés *pathogen associated molecular patterns*) (Medzhitov y Janeway, 1997). Las PRPs son moléculas producidas por el hospedero, secretadas hacia el plasma o localizadas en la superficie de las células, principalmente las del sistema inmune, que reconocen y se unen a los PAMPs. En los invertebrados, los principales PAMPs reconocidos por PRPs son los lipopolisacáridos LPS de la superficie de las bacterias Gram-negativas y peptidoglucanos (PGs) de la pared de las Gram-positivas, los β -1,3-glucanos de la pared de hongos y el dsRNA (en inglés, *double-stranded RNA*) producido durante la replicación de varios virus (Lee y Söderhäll, 2002). Estos PAMPs, característicos de microorganismos y ausentes en el hospedero, son esenciales para la supervivencia de los

microorganismos, lo que significa que estos blancos de la inmunidad innata no pueden ser evolutivamente descartados por los microbios, para evadirse del reconocimiento por el hospedero. Una vez dentro del hospedero, los patrones moleculares del patógeno son reconocidos y unidos a sus respectivas PRPs y en el caso de los crustáceos, inician la activación principalmente de los hemocitos, desencadenando una respuesta inmunocelular o la liberación de una serie de moléculas inmunoefectoras por degranulación o, aún más, por modular la expresión de genes inmunológicos específicos. Varias PRPs fueron identificadas y caracterizadas en la hemolinfa de los crustáceos, tales como la proteína que se une a los LPS o LBP (en inglés, *LPS-binding protein*), las proteínas que se unen a los β -1,3-glucanos o β GBP y GBP (del inglés, *β -glucan binding proteins*), la proteína que se une a ambos LPS y β -1,3-glucanos o LGBP, la proteína "mas-like" (en inglés, *masquerade-like protein*) que reconocen varios microorganismos y varias clases de lectinas (Lee y Soderhall, 2002).

El sistema de activación de la pro-fenol oxidasa (proPO), es reconocido como una de las principales respuestas inmunoefectoras de los crustáceos desencadenada por componentes de la superficie de microorganismos, como los LPS de bacterias Gram-negativas y los β -1,3-glucanos de hongos (Cerenius y Söderhäll, 2004). Durante las infecciones, estos compuestos se unen a receptores de los hemocitos granulares directamente o a través de PRPs plasmáticas e inducen una degranulación o exocitosis regulada, con la liberación de varias moléculas inmunoefectoras, entre las cuales están las

moléculas del sistema proPO. Una vez liberadas, ocurre la activación de este sistema por los propios componentes de los microorganismos presentes en el hemocele. La activación de la forma inactiva o proPO hacia la enzima activa o fenol oxidasa (PO), ocurre por la acción de serino-proteasas denominadas enzimas activadoras de la proPO (en inglés, *proPO-activating-cascade enzymes* o *PPAEs*), iniciando una cascada proteolítica cuyo producto final es la melanina. La forma PO es una óxido reductasa que cataliza dos reacciones sucesivas; la primera, de hidroxilación de un monofenol a o- difenol (actividad monofenoloxidásica) y la segunda, de oxidación del o-difenol a o-quinona (actividad difenoloxidásica). La producción de o-quinonas resulta en la síntesis de la melanina a través de una cascada de reacciones químicas intermedias, siendo la mayoría espontánea, no mediadas por enzimas. La producción de quinonas lleva también a la esclerotización de la cutícula de los crustáceos, fenómeno esencial en los períodos de muda (Söderhäll y Cerenius, 1998). Con relación al papel inmunológico del sistema proPO, se conoce que esta vía genera transitoriamente moléculas altamente tóxicas, como las quinonas, hemiquinonas y radicales libres de oxígeno, como las propias ROIs, una vez que ocurre consumo de oxígeno molecular y que llevan a una destrucción de los patógenos invasores. El pigmento oscuro e insoluble o melanina parece tener una actividad fungistática (Cerenius y Söderhäll, 2004) y puede todavía funcionar como eliminador “*scavenger*” de radicales libres (Nappi y Ottaviani, 2000), minimizando así los efectos de estas moléculas altamente tóxicas

para el organismo del hospedero. Debe ser resaltado que la melanina, no es la molécula inmunoefectora más importante durante la activación del sistema proPO, siendo los compuestos citotóxicos intermedios los más efectivos (Nappi y Vass, 1993). De esta manera, la melanización representa, más específicamente, el final de un proceso inmunoefector. Cabe resaltar que, conjuntamente a la liberación de los componentes del sistema proPO, otras varias moléculas son también exocitadas por los hemocitos inmunoestimulados. Una de ellas es la peroxinectina (76 kDa) que es una peroxidasa, homóloga a la mieloperoxidasa humana y que actúa en la adhesión celular manteniendo su actividad peroxidásica. Esta proteína gana su actividad biológica conjuntamente a la activación del sistema proPO en el plasma y promueve el encapsulamiento de parásitos invasores de gran tamaño, luego de unirse al receptor de la superóxido dismutasa (SOD) de la membrana de los hemocitos, mencionado anteriormente (Johansson *et al.*, 1999). Por otro lado, la peroxinectina induce además a una fuerte degranulación de los hemocitos, llevando a la liberación de más compuestos inmunoefectores y consecuentemente a una acentuada amplificación de la respuesta inmunológica del hospedero. Otras moléculas son también exocitadas durante la activación hemocítica, como la enzima transglutaminasa (TGasa) que induce el proceso de coagulación, diferentes inhibidores de proteasas, PRPs como la "mas-like", AMPs y otras moléculas inmunoefectoras (Lee y Söderhäll, 2002; Cerenius y Söderhäll, 2004). La activación del sistema proPO, es estrictamente regulada para evitar una

activación no deseada o generalizada en el organismo del crustáceo. Para eso, los animales poseen inhibidores de proteasas en el plasma y/o hemocitos. Entre ellos podemos destacar la pacifastina, los inhibidores de la familia Kazal, la serpina y la α 2-macroglobulina (Hergenhahn *et al.*, 1988).

La coagulación de la hemolinfa es un mecanismo inmunológico esencial para la supervivencia de animales invertebrados con un sistema circulatorio abierto o semi abierto como los crustáceos. Ella previene tanto la pérdida de la hemolinfa, como la diseminación de los patógenos por la cavidad corporal del animal. En los invertebrados son reconocidos dos diferentes mecanismos de coagulación (Theopold *et al.*, 2004; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). El primero es una cascada proteolítica activada por componentes microbianos, como LPS y β -1,3-glucanos, ocurriendo en limúlideos, como en *Tachypleus tridentatus* y el segundo es una reacción de coagulación dependiente de la enzima transglutaminasa (TGasa), que se encuentra en insectos y crustáceos. En el caso de la coagulación de los crustáceos, un componente clave en el proceso de gelificación del plasma es la proteína de coagulación (CP), que forma coágulos estables por medio de una reacción de unión cruzada entre sus moléculas, mediadas por la TGasa (Martin *et al.*, 1991; Muta e Iwanaga, 1996). Las TGasas son enzimas Ca^{2+} dependientes, usualmente compartimentalizadas dentro de los hemocitos de los crustáceos, capaces de formar uniones covalentes γ -glutamil- ϵ -lisina entre ciertas proteínas, como la proteína de coagulación presente en el plasma (Lorand y Conrad, 1984).

Como se mencionó anteriormente, las enfermedades virales constituyen actualmente, la más seria amenaza para la industria de la camaronicultura a nivel mundial y el principal riesgo para la sostenibilidad de la actividad. En los vertebrados, las infecciones virales inducen a varias respuestas inmunológicas, que en última instancia buscan controlar la replicación y propagación de los virus y los daños celulares causados por ellos. Entre estas respuestas se destacan, (1) La destrucción de las células infectadas por las células NKs (del inglés, *natural killer*) y linfocitos T citotóxicos (CTLs), (2) La producción de anticuerpos neutralizantes para virus, (3) La inducción de proteínas del sistema interferón (IFN) que activan la transcripción de diversos genes que protegen las células de los daños causados por los virus, generando un estado antiviral y, (4) El silenciamiento de genes virales por la vía del RNA de interferencia (RNAi).

El Sistema interferón en los camarones; recientemente la expresión de una proteína homóloga al IFN- α de los mamíferos fue reportada por primera vez en un invertebrado, en los hemocitos del penaeido *M. japonicus* (He *et al.*, 2005), esta proteína denominada IntIP (en inglés, *interferon-like protein*; GenBank AY695938) sólo se expresa en camarones supervivientes a la infección por WSSV y no en camarones sanos. El sistema RNA de interferencia (RNAi); es capaz de desencadenar el mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes, conocido por RNA de interferencia o RNAi (Hannon *et al.*, 2002). En este proceso el dsRNA (en

inglés *double stranded RNA*) desencadena la destrucción de RNAm homólogos a su secuencia. El RNAi representa un mecanismo de defensa natural contra virus y transposones, presente en los diferentes seres vivos desde plantas hasta mamíferos (Hannon *et al.*, 2002). En animales, este mecanismo fue primeramente descrito en el nematodo *C. elegans* (Fire *et al.*, 1998). De forma resumida, la activación de estos sistemas se inicia por el procesamiento de precursores largos de dsRNA en RNAs pequeños de 21-25 pb, siRNAs (en inglés *small interfering RNA*) en español ARN interferente pequeño y los micro ARNs miRNAs (en inglés, *micro-RNA*) por la enzima Dicer semejante a la RNase III. Estos pequeños RNAs proporcionan las secuencias específicas para un complejo de silenciamiento multiprotéico inducido por el RNA (RISC), que dirige una degradación específica o la represión de la traducción del RNAm con regiones complementarias a las secuencia de dsRNA desencadenante (Robalino *et al.*, 2007).

La inducción de apoptosis se inicia en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo las infecciones virales y envuelve varias alteraciones morfológicas celulares, como la condensación de la cromatina, la fragmentación del núcleo, el *blebbing* de la membrana o evaginaciones esféricas de la membrana, la reducción del tamaño celular y finalmente la fragmentación de la célula en pequeñas vesículas revestidas por la membrana, denominadas cuerpos apoptóticos, que son en general rápidamente fagocitados por las células vecinas. Las alteraciones

bioquímicas subyacentes a estas alteraciones morfológicas, incluyen la activación de enzimas nucleasas y proteasas, dentro de las cuales se destaca la familia de las caspasas. Éstas tienen un papel crucial en el proceso apoptótico, pues catalizan muchos de los diferentes pasos en la muerte celular. Muchas proteínas virales alteran la fisiología celular y proporcionan señales celulares que inducen la muerte celular. Debe ser resaltado que la simple inducción de la apoptosis en estadio precoz de la infección viral, puede limitar la producción de partículas virales y reducir o eliminar la propagación de la progenie viral para otros tejidos. Sin embargo, muchos virus consiguen retardar el proceso apoptótico, matando las células apenas en el final del ciclo infeccioso (Roulston *et al.*, 1999). La apoptosis celular en estadio final del ciclo de la replicación viral, ofrece muchas ventajas a los virus. Durante este proceso, todo el contenido celular, incluyendo la progenie del virus, es empacado en los cuerpos apoptóticos. Los virus son así indetectables para el sistema inmune, estando protegidos dentro de los cuerpos apoptóticos. Evitan de esta manera respuestas inflamatorias y su inactivación por proteasas y anticuerpos del hospedero. Estos cuerpos apoptóticos, alojando innumerables virus replicados, son enseguida rápidamente fagocitados por las células vecinas e irónicamente garantizan la propagación y la infección viral. O sea, la inducción de una apoptosis tardía parece ser una óptima estrategia de propagación para el virus que evolutivamente no desarrollaron todavía defensas anti apoptóticas u otros mecanismos de evasión inmunológica (Roulston *et al.*, 1999). Un

aumento progresivo de la apoptosis hasta niveles muy altos, que compromete varios tejidos, puede ser la causa principal de la muerte de los camarones. En *M. japonicus* infectados por WSSV, la incidencia de la apoptosis se mostró muy alta, teniendo como resultado mortalidades elevadas (Wu y Moroga, 2004).

El concepto de acomodación viral propone que los crustáceos se adaptan a los nuevos virus patógenos que surgen, desarrollando una especie de memoria específica que impide el mecanismo de apoptosis inducido por el virus. Todo indica que los camarones supervivientes desarrollan una tolerancia a los virus y se vuelven portadores de infección persistente, sin ningún efecto negativo aparente o signo de enfermedad. La condición de tolerancia adquirida por los camarones supervivientes, permanece por toda su vida y es transferida en baja dosis para toda su progenie que también desarrolla infecciones virales persistentes, sin todavía desencadenar la enfermedad. Este concepto encuentra soporte en el hecho de que las infecciones dobles, triples y múltiples son frecuentemente detectadas en camarones de apariencia saludable, lo que sugiere que las infecciones persistentes actúan como una especie de "memoria", que lleva a una disminución específica de la severidad de la enfermedad a través de la reducción de la apoptosis inducida por el virus. El concepto de acomodación viral propone que el camarón coexiste con los virus sin haber efectos negativos, debido a un proceso combinado virus-hospedero, que comprende la reducción del proceso apoptótico en el hospedero inducido por el virus.

(Flegel, 2007). Este concepto fue reforzado, al ser evidenciado que los camarones sin signos de la enfermedad, pero con infección viral persistente, no presentan apoptosis en las células infectadas (Wongprasert *et al.*, 2003). Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a la tolerancia a los virus patógenos por el camarón, son todavía desconocidos y probablemente distintos de la tolerancia inmunológica de los vertebrados. Por otro lado, falta también confirmar si esta aparente tolerancia adquirida es efectivamente provocada por una reducción de apoptosis, o si es debida a otros procesos moleculares de control viral todavía desconocidos.

Existen otros mecanismos antivirales entre ellos está; el papel del AMP de amplio espectro, las defensas antivirales de crustáceos, los mecanismos de evasión viral en los camarones y los más destacados actualmente son la supresión del proceso apoptótico en la célula infectada y el silenciamiento de los productos génicos virales, vía-RNAi.

Los inmunoestimulantes son usualmente utilizados en los cultivos de camarones sobre formas de baño (inmersión de los animales), como suplemento en la dieta o, más raramente sobre forma de inyección (aparentemente más eficaz). Se torna evidente, que entre estos métodos, la adición del inmunoestimulante en la ración, es más viable para la utilización en las granjas de cultivo. Las otras dos formas de administración (inyección y baños) son menos viables, pero pueden ser útiles para el tratamiento de larvas y reproductores, o para experimentos en laboratorio cuyo principal objetivo sea comprender el mecanismo de acción de estos compuestos. Su

absorción aparentemente intacta por la cutícula del intestino para llegar a la hemolinfa a fin de activar el sistema inmunológico del camarón. En este sentido la posibilidad actual, de cuantificar con precisión, los niveles de expresión de los diferentes inmunomarcadores por PCR en tiempo real, deberá traer ciertamente una importante contribución en la evaluación del estado de inmunocompetencia de los animales, mediante el tratamiento con inmunoestimulantes. El uso de sustancias capaces de aumentar la inmunocompetencia de los langostinos, en paralelo a un buen manejo del cultivo, apunta ciertamente como una herramienta promisoría en la búsqueda de una mayor protección inmunológica contra el desarrollo de infecciones. (Fagutao *et al.*, 2008). Los inmunoestimulantes son moléculas que se derivan de paredes celulares de microorganismos y que activan el sistema inmune. Estos componentes activos son fragmentos de péptido muramil (peptidoglicanos), lipopolisacaridos (LPS), presentes en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En la pared celular de la levadura y hongos existen principalmente β -glucanos que son moléculas de poliglucosas ligadas a través de cadenas de 1,3 y con ramificaciones de 1,6 de glucosa (Dalmo *et al.*, 1998; Le Moullac *et al.*, 1998). Los LPSs son muy potentes cuando se han probado in vitro. Sin embargo, estos productos pueden causar inflamaciones severas y pueden ser tóxicas en concentraciones ligeramente por arriba de la dosis óptima. Los LPSs inducen la producción de señales moleculares (citoquinas) las cuales reducen el apetito y suprimen el crecimiento de los animales (Raa, 2000).

Recientemente muchos genes que están involucrados con el sistema inmune del langostino han sido descubiertos y caracterizados entre ellos proteína de tumor controlada transcripcional y tranduccionalmente (TCTP) (en inglés translationally controlled tumour protein) también llamada fortilin, otros genes, sintenin y el factor 5A de iniciación de traducción eucariótica (eIF5A), fueron caracterizados y demostrada su función de protección contra la muerte de langostinos infectados por WSSV. En crustáceos el gen de TCTP o fortilin fue descubierto en *Penaeus monodon* por lo que fue llamado Pm-fortilin. Este gen traduce una proteína que está bien conservada con un dominio ligado a Ca^{++} ; similar a la de los genes que han sido reportados para plantas y animales. Pm-fortilin ha demostrado tener similares propiedades antiapoptóticas a sus homólogos humanos y en otras células de mamíferos. (Bangrak *et al.*, 2004). Fortilin se expresó en todos los organismos eucariotas y en más de 500 tipos de células y tejidos investigados hasta ahora. Sin embargo los niveles de expresión varían ampliamente, dependiendo del tipo de células o tejidos (Thiele *et al.*, 2000) y la etapa de desarrollo (Gnanasekar *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2002) TCTP se expresa en los tejidos de actividad mitótica, mientras que los niveles de expresión son bajos en los tejidos como el cerebro con actividad postmitóticas (Thiele *et al.*, 2000). En numerosos condiciones experimentales y en los sistemas biológicos, se estableció que los niveles de fortilin están altamente regulados en respuesta a una amplia variedad de señales extracelulares y las condiciones celulares, por lo general por las señales de crecimiento (Bommer y Thiele, 2002) y

citoquinas (Nielsen *et al.*, 1998; Teshima *et al.*, 1998) las diversas condiciones de estrés tales como el choque de calor, metales pesados, estrés de calcio, inanición (Xu, Bellany y Taylor, 1999) señales de proapoptosis o citotoxicidad (Oikawa *et al.*, 2002) inducen la rápida síntesis de fortilin (Bommer y Thiele, 2002), resulta en cualquiera de los casos en el alza o baja de niveles de fortilin (Bommer y Thiele, 2002; Gachet *et al.*, 1999)

Algunas proteínas potenciales han sido identificados como probabilidades de estar involucrados en el mecanismo antiviral en los camarones, incluyendo la caspasa (Wang *et al.*, 2010), la hemocianina (Zhang *et al.*, 2010), Pm-fortilin (Tonganunt *et al.*, 2010), Fclectin (Liu *et al.*, 2010), LvCTL1 (Zhao *et al.*, 2010), PmAV (Zhang *et al.*, 2010) y PmLT (Ma *et al.*, 2008). Sin embargo, los mecanismos relacionados con la inmunidad antiviral en el camarón siguen siendo difícil (Prapavorarat *et al.*, 2010).

A fin de resaltar el papel inmune del gen fortilin en el langostino blanco, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los niveles de expresión temporal del gen fortilin en relación a ensayos de inducción con lipopolisacáridos de *E. coli*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ACLIMATACIÓN Y AGRUPACIÓN

Se trabajó con 150 individuos de “langostino blanco” *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 25 g de peso cada uno, obtenidos del Centro de Investigación y Desarrollo de Post Larvas de Langostinos Marinazul S.A. Ubicada en el Departamento de Tumbes, Provincia del Contralmirante Villar, distrito de Canoas de Punta Sal, caleta de Punta Mero (Latitud Sur 03° 54'26"S y 80° 52'43"O). Estos animales fueron aclimatados por siete días en tanques de polietileno de 600 L de volumen, con aireación, a razón de 50 individuos en cada tanque, seleccionados al azar en tres grupos de trabajo (Grupo control no inyectado (SI), grupo control inyectado con solución salina (SSS) y grupo inyectado con lipopolisacáridos de *E. coli* (LPS)) bajo condiciones ambientales iguales, las cuales fueron medidas diariamente. A todos los grupos se les suministró alimento balanceado comercial Nicovita® (acabado 35%) durante la realización del estudio.

2. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Los langostinos fueron inyectados por punción intramuscular (entre el 3° y 4° metámero) con 50 µl de LPS de *E. coli* (Sigma®) a una concentración de 0,2 mg/ml y dosis de 0,4 mg LPS/Kg peso. El grupo control no fue inyectado, mientras que al segundo grupo control se le inyectó 50 µl de Solución Salina de Langostino a una concentración de 450 mM (0,85%) (Ver anexos).

Los niveles de expresión del gen fortilin fueron medidos en seis tiempos de muestreo: a las 3 hrs, 6 hrs, 9 hrs, 12 hrs, 24 hrs y 48 hrs post inducción, por punción ventral (seno venoso). La evaluación fue realizada al azar por quintuplicado, se tomaron 5 individuos en cada uno de los grupos de trabajo en cada hora de muestreo y para evitar su reevaluación los individuos muestreados fueron separados continuamente.

3. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO

Se extrajo 200 μ L de hemolinfa a partir del seno venoso ventral empleando jeringas de 1 mL con solución anticoagulante MAS (ver anexos) (Somboonwiwat, 2010) en relación 1:1 (400 μ L volumen final) (Liu, 2009), los cuales se depositaron en microtubos (Eppendorf 1.5 mL) y homogenizados por inversión. Posteriormente fueron centrifugados a 4000 rpm por 20 min para la obtención del pellet de hemocitos, descartando el sobrenadante de los mismos. Seguidamente se le agregó 300 μ L de Trizol con pipeteo continuo y se le adicionó 80 μ L de cloroformo helado, homogenizando y dejando reposar por 30 min a -20°C . Luego se centrifugó a 12000 rpm por 20 min a 4°C , recuperando el sobrenadante acuoso en otro microtubo y adicionándole 200 μ L de Isopropanol helado. Se incubó a -20°C por 2 horas y se centrifugó a 12000 rpm a 4°C por 10 min para precipitar los ácidos nucleídos, descartando el sobrenadante y lavando el pellet dos veces con 500 μ L de etanol 75° , centrifugando por 5 min a 4°C a 12000 rpm en cada

lavado. Después de los lavados, se desechó el sobrenadante y se secó el precipitado a temperatura ambiente por 10 min cerca de un mechero.

El precipitado obtenido se resuspendió en 11 µL de agua ultrapura libre de nucleasas. La solución se trató la enzima DNasa del kit DNase I RNase-free (Fermentas®, ver anexos) y se incubó a 37° C por 30 min. La inactivación de la enzima se realizó a 65°C por 10 min.

Para la síntesis de ADN complementario (cDNA) de las muestras de ARN obtenidas hasta el momento, se empleó el Kit Thermo Scientific RT-Fermentas®, bajo el cual se mezclaron 5 µL de ARN muestra (normalizado finalmente a 100 ng/µL), 1 µL de Oligo dT (18) (0,5 µ/uL) y 6.5 µL de H₂O libre de nucleasas. Esta mezcla fue calentada a 65°C por 5 min. Seguidamente se agregó 0.5 µL inhibidor de RNasa (RiboLock RNase Inhibitor), 4 µL de buffer MMLV-RT (5X), 2 µL de dNTP (10 mM) y 1 µL MMLV (1µ/µL). La mezcla final fue incubada a 42°C por 55 min y luego 72°C por 15 min. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su uso en qPCR.

4. DISEÑO DE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA FORTILIN

La evaluación de la expresión de fortilin se realizó a través de primers específicos elaborados in silico en regiones conservadas del gen de fortilin de crustáceos (4 langostinos y 1 cangrejos. Ver cuadro 1), usando secuencias completas publicadas en NCBI/Gen-Bank* para cada uno de ellos. Estas secuencias fueron alineadas a través del software Clustal W

versión 1.7 (European Bioinformatic Institute) y con ayuda de los programas virtuales PrimerBlast (National Center for Biotechnology Information) y Primer 3 versión 0.4.0 (White head Institute for Biomedical Research) se evaluaron las posibles secuencias de primers y los parámetros deseados de los mismos (localización, longitud, T° melting, %GC, entropía, entalpía, heterodímeros, homodímeros). Las secuencias seleccionadas de primers fueron posteriormente enviadas a sintetizara EUROFINS MWG OPERON (USA).

TABLA1: Secuencias genómicas* de fortilin de especies relacionadas

<u>N°Accesion Especie</u>
EU305625.1 <i>Litopenaeus vannamei</i>
AY186580.1 <i>Penaeus monodon</i>
DQ205420.1 <i>Fenneropenaeus chinensis</i>
EU884392.1 <i>Penaeus monodon2</i>
FJ890311.1 <i>Fenneropenaeus indicus</i>
EU294259.1 <i>Marsupenaeus japonicus</i>
ACY66461.1 <i>Scylla paramamosain</i>

(*)<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=genbank>

5. ANÁLISIS DE SECUENCIAS AMPLIFICADAS

Los primers fueron evaluados por PCR simple, con muestras de cDNA de hemolinfa de Langostino blanco *Litopenaeus vannamei*. Dicha PCR fue realizada con el siguiente programa de amplificación.

TABLA 2: Condiciones de amplificación del gen fortilin por PCR

40 ciclos	Etapas	T (°C)	Tiempo (min)
	Desnaturalización inicial	95	5:00
	Desnaturalización	95	0:30
	Hibridación	60	0:30
	Extensión	72	0:45
	Extensión final	72	5:00
	Conservación	4	---

Los productos resultantes de la PCR fueron migrados en un gel de agarosa al 1% para descartar productos inespecíficos, seguidamente fueron enviados a secuenciar a MACROGEN Corp. (USA).

Las secuencias obtenidas (tanto forward y reverse, esta última convertida a su reverso complementario) de cada producto, se alinearon con ayuda del programa *MEGA* version 5 (Tamura *et al.*, 2011), obteniendo la secuencia consenso del producto, la cual fue comparada con la base de datos de *Litopenaeus vannamei* (Taxid: 6689) haciendo uso de la herramienta virtual

Standard Nucleotide BLAST (NCBI) para evaluar la especificidad de los mismos.

6. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN

La cuantificación de los niveles de expresión de fortilin se realizó en un equipo LightCycler® 480 de ROCHE® a través de la técnica de qPCR (Quantitative PCR), empleando el kit Light Cyclder® 480 SYBR GREEN y el LightCycler® 480 Software versión 1.5.0.39.

Para la preparación de la reacción de qPCR se agregaron 7,5 µL de Light Cyclder® 480 SYBR Green I Master (2X), 2 µL de primers (1 µL de primer forward y 1 µL de primer reverse), 1 µL de ARN de muestra y 4.5 µL de agua ultrapura grado PCR. Cada mix de reacción fue colocado en un pocillo de una placa LightCycler 480 Multiwell Plate 96-well, la cual fue cubierta con una lámina plástica adhesiva para evitar la evaporación. La cantidad de muestra (ARN) fue normalizada a 100 ng/µL en todas las muestras. El programa seguido para la qPCR fue el siguiente:

TABLA 3: Condiciones de amplificación del gen fortilin por Real Time-PCR (qPCR)

40 ciclos	Etapas	Temp. (°C)	Tiempo (min)	Ramp (°C/s)	Adquisición
	Desnaturalización inicial	95	5:00	4.40	No
	Desnaturalización	95	0:10	4.40	No
	Hibridación	58	0:10	2.20	No
	Extensión	72	0:10	4.40	Simple
	Melting Curve	95	0:30	4.40	No
		55	1:00	2.20	No
		95	---	0.06	Continua
	Conservación	4°C	0:30	1.50	No

Se empleó la expresión del gen constitutivo Elongation Factor Alfa (EFA) como control interno (ver anexos). Además se agregó una muestra estándar de EFA en la placa para su extrapolación en la curva estándar ($5,8 \times 10^7$).

Los resultados obtenidos, expresados en el “punto de cruce” (Cp por sus siglas en inglés), de la qPCR fueron discriminadas tomando la “temperatura de fusión” (Tm por sus siglas en inglés) específico para cada producto, eliminando aquellos productos que no sean específicos. Los datos seleccionados fueron promediados tanto para el gen fortilin como para el gen EFA en sus distintos tiempos de muestreo. Posteriormente se realizó el análisis de la expresión relativa de fortilin en función del gen de referencia

EFA por el método basado en la Eficiencia (E) de la Real time PCR y la diferencia (Δ) del punto de cruce (Cp) de cada muestra versus el control Δ Cp (control-muestra), descrito en (Pfaffl, 2002), el cual consiste en el análisis de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Razón} = (E_{\text{Fortilin}})^{\Delta C_p \text{fortilin}(\text{control-muestra})} / (E_{\text{EFA}})^{\Delta C_p \text{EFA}(\text{control-muestra})}$$

El análisis estadístico se realizó mediante el software STATGRAPHICS Centurion XV. I, a través de estadísticos de varianza (ANOVA) seguido por pruebas de significancia (F-test) de rangos múltiples, agrupando por horas y tratamientos.

RESULTADOS

3.1 ESPECIFICIDAD SOBRE EL GEN FORTILIN DE *Litopenaeus vannamei*

El secuenciamiento del producto amplificado por los primers empleados en el presente trabajo mostró alta especificidad, con identidad de 100% y 99% de cobertura únicamente con la secuencia de fortilin o TCTP de *Litopenaeus vannamei*.

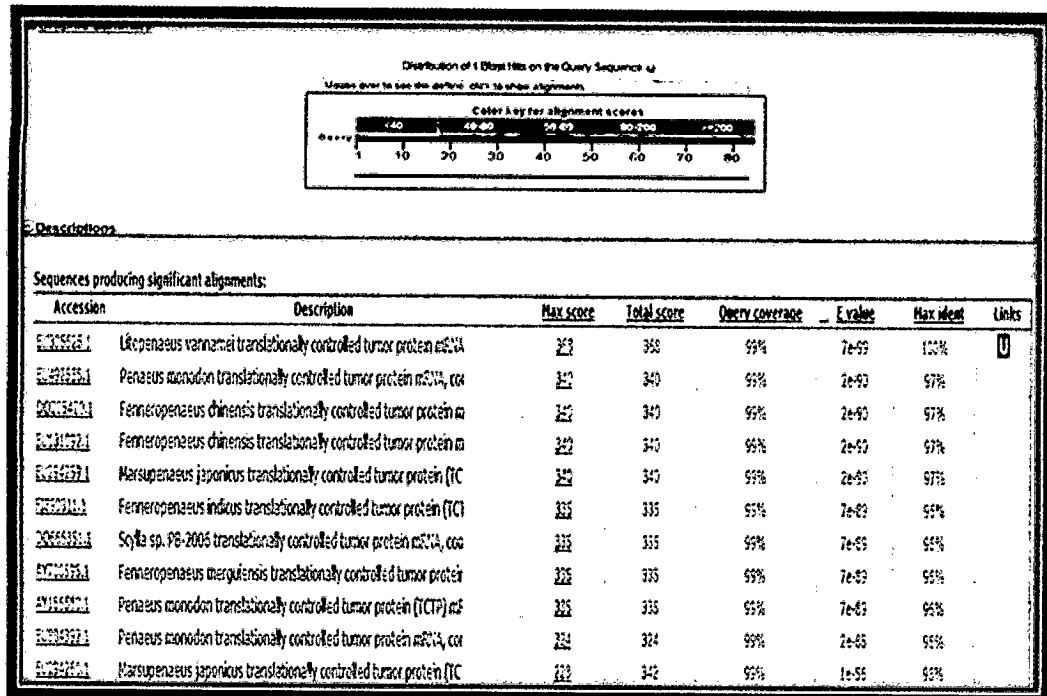


Figura 1: Especificidad de primers sobre el gen fortilin o TCTP

3.2 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FORTILIN POR REAL TIME-PCR

Los resultados de los niveles de expresión de fortilin en función al gen de referencia Elongation Factor Alfa (EFA), mostró variación bajo la inducción con LPS a través del tiempo, en relación a los niveles de expresión del grupo control no inyectado y el grupo control inyectado con SSS.

TABLA 4: Tabla resumen de los niveles de expresión temporal del gen fortilin en función a EFA bajo los diferentes tratamientos

TIEMPO	TRATAMIENTOS		
	SI/LPS	SSS/LPS	SI/SSS
03hrs	0.02 veces el control SI	6.14 veces el control SSS	0.003 veces el control SI
06hrs	3.69 veces el control SI	19.8 veces el control SSS	0.186 veces el control SI
09hrs	124.08 veces el control SI	106.34 veces el control SSS	1.167 veces el control SI
12hrs	74.48 veces el control SI	19.76 veces el control SSS	3.769 veces el control SI
24hrs	13.56 veces el control SI	0.8 veces el control SSS	2.563 veces el control SI
48hrs	2.91 veces el control SI	5.51 veces el control SSS	0.528 veces el control SI

SI : Sin Inyección
 SSS : Solución Salina de Langostino
 LPS : Lipopolisacáridos de *E. coli*

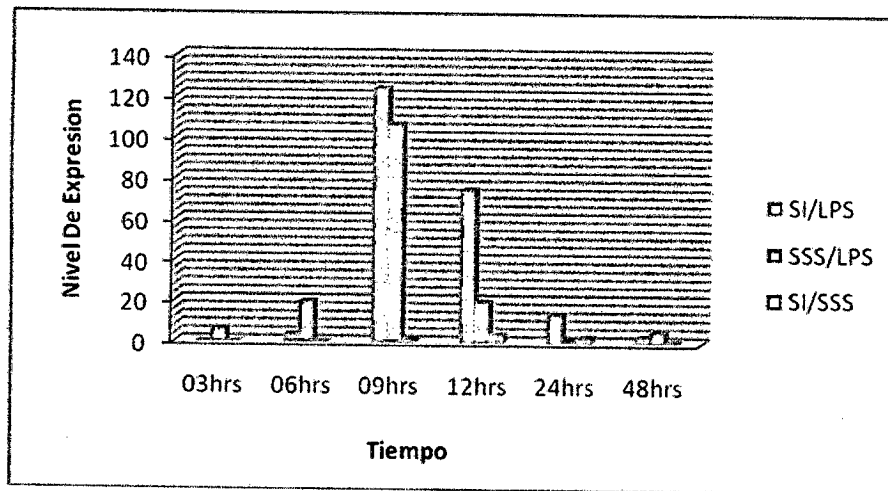


FIGURA 2: Niveles de expresión temporal de fortilin en función a EFA bajo los tratamientos

La comparación de los niveles de expresión de fortilin con los diferentes tratamientos mostró que la inducción con LPS en relación a ambos controles muestran sobreexpresión de fortilin a las 9 y 12 horas y expresión reducida a las 03, 06, 24 y 48 horas.

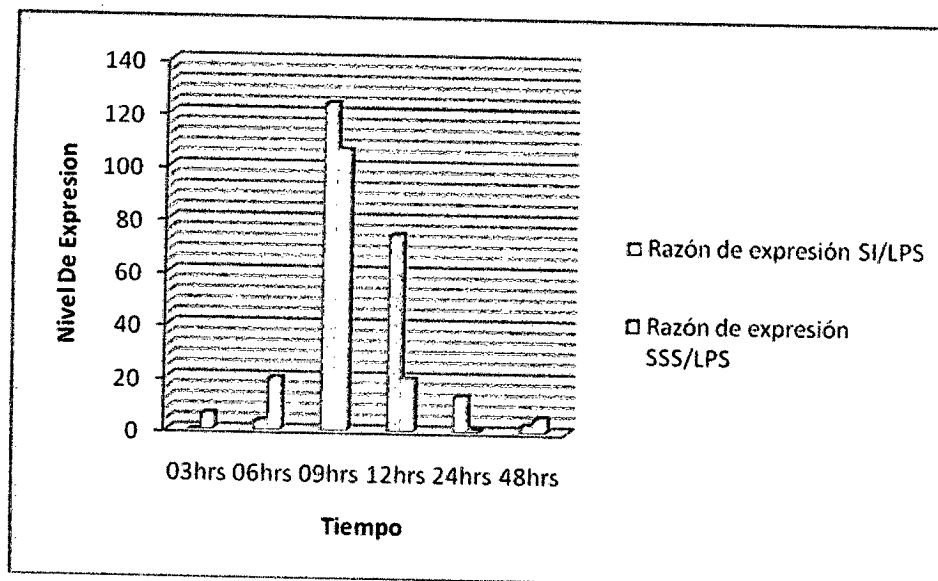


FIGURA 3: Niveles de expresión temporal de Fortilin en función a EFA bajo tratamiento de inducción con LPS en relación a los controles: sin inyección e inyectados con SSS.

Los resultados de los niveles de expresión del gen fortilin en función del tiempo mostraron un incremento significativo ($P < 0.05$) a las **09 y 12 horas** post inducción con LPS, a las **09 horas** alcanza, hasta 124 veces el control SI y 106 veces el control SSS y a las **12 horas** 74,48 veces el control SI y 19.76 veces el control SSS. A las **03 hrs, 06 hrs, 24 hrs y 72 hrs** post inducción con LPS en langostinos no hubo incremento significativo cuando se compara con animales de los grupos control: sin inyectar e inyectados con solución salina. A las **3 horas** de inducción se observó, niveles de expresión más bajos de 0.02 veces el control SI y 6.14 veces el control SSS. A las **6 horas** se observó un ligero incremento en la expresión de fortilin de 3.69 veces el control SI y 19.80 veces el control SSS. Los resultados de la

expresión a las **24 horas** de post inducción con LPS, continuo disminuyendo a 13.56 veces al control SI y 0.8 veces al control SSS siendo este el más bajo. A las **48 horas** de la inducción los niveles de expresión del gen, alcanzaron 2.91 veces el control SI y 5.51 veces el control SSS.

DISCUSIÓN

Fortilin puede ser regulado en respuesta a una amplia gama de señales extracelulares y condiciones celulares (Bommer y Thiel, 2004), tales como señales pro-apoptóticas y citotóxicas (Oikawa *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2000). Una amplia variedad de productos químicos como lipopolisacáridos, agentes citotóxicos y metales pesados son capaces de inducir la expresión del gen fortilin. (Yubero *et al.*, 2009). Por tal, la expresión del gen en hemocitos de *L. vannamei* se estimuló con lipopolisacarido de *E. coli*, obteniendo como respuesta del sistema inmune del langostino el aumento significativo de la expresión del gen en el tiempo.

Tonganunt *et al.*, 2008 empleó la técnica de PCR en tiempo real para medir los productos de amplificación de fortilin de *P. monodon* en individuos sanos e infectados con el virus de la mancha blanca (WSSV) demostrando que los transcriptos de fortilin incrementan significativamente ($P < 0.05$) a las 24 hrs y 48 hrs después de la infección viral, a las 6 hrs, 12 hrs y 72 hrs en camarones infectados no hubo incremento significativo cuando se compara con animales normales, en otros estudios sobre los niveles de expresión de fortilin (Rajesh *et al.*, 2010) obtuvo resultados similares al medir la expresión de fortilin en hemocitos de *P. indicus*, los niveles del mensaje de fortilin se encontraron elevados en hemocitos de camarones infectados con el WSSV comparados con los no infectados. En el presente trabajo se empleó la misma técnica para la cuantificación de la expresión de fortilin en hemocitos

de *L. vannamei*, los niveles del mensaje del gen se encontraron altos en hemocitos de langostinos inducidos con LPS en comparación con los no inducidos. Los transcritos de fortilin incrementaron significativamente ($P < 0.05$) a las 9 horas post inducción con lipopolisacarido, a las 3 hrs, 6 hrs, 12 hrs, 24 hrs y 48 hrs en hemocitos de langostinos inducidos no hubo incremento significativo cuando se compara con hemocitos de animales sin inyectar e inyectados con solución salina.

Fortilin está muy regulada en la hemolinfa del langostino, este es un gen involucrado en el sistema inmune, muestra la función de protección al langostino infectado por WSSV frente a la muerte (Tonganunt *et al.*, 2008). Si la expresión elevada del gen fortilin protege de la muerte a los langostinos infectados con WSSV, podría significar que fortilin puede proteger a los hemocitos de la apoptosis (Graidist *et al.*, 2006). La disminución marcada de la expresión de fortilin en langostinos moribundos infectados con WSSV apoya la hipótesis de que la apoptosis inducida por WSSV es parte de la fisiopatología que lleva a la muerte de los langostinos. Esto también es apoyado por la alta expresión de fortilin reportado para los sobrevivientes de WSSV. Las caspasas y fortilin son genes implicados en el proceso de apoptosis, ellos están altamente regulados en camarones peneidos después de la infección por WSSV. Hasta ahora, el papel de la apoptosis en el mecanismo antiviral de camarón es todavía controvertida (Prapavorarat *et al.*, 2010).

En mamíferos, en células de embriones de ratón se comprobó que TCTP es una proteína anti-apoptótica que se inserta en la membrana mitocondrial evitando la dimerización de la proteína pro-apoptótica BAX, que es la que permite la permeabilidad de la membrana durante la apoptosis, es decir, TCTP inhibe la apoptosis inducida por BAX, es importante destacar que TCTP se une a MCL1 y Bcl-XL, ambos miembros antiapoptóticos de la familia Bcl2 (Susini *et al.*, 2008).

En el estudio del papel de fortilin en *Eriocheir sinensis* en condiciones de estrés después del tratamiento con CuSO₄. Se midió la expresión temporal de las transcripciones de fortilin en el hepatopáncreas alcanzando su punto máximo a las 24 hrs (4,3 veces mayor que el control), y todavía se mantuvo alto después de 72 hrs, los resultados indican que fortilin tiene una posible función anti-estrés en los invertebrados (Wang *et al.*, 2011). En otro estudio, en líneas celulares agresivas de cáncer, fortilin mostró regulación llamativa (hasta 124 veces que el control en el nivel transcripcional), la sobreexpresión de fortilin redujo la sensibilidad de líneas celulares de cáncer a los agentes quimioterapéuticos, tales como etopósido y 5-Fluoracil (Graidist *et al.*, 2004). El nivel de expresión de fortilin en hemocitos de *L. vannamei* a las 9 horas después de la inducción con lipopolisacárido de *E. coli* fue 124 veces más alto que en hemocitos de *L. vannamei* sin inyectar y 106 veces más que en hemocitos de *L. vannamei* inyectados con solución salina, estos fueron sus puntos máximos de expresión. Fortilin se expresó en todos los

organismos eucariotas y en más de 500 tipos de células y tejidos investigados hasta ahora. Sin embargo los niveles de expresión varían ampliamente, dependiendo del tipo de células o tejidos (Thiele *et al.*, 2000) y la etapa de desarrollo (Gnanasekar *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

- Los niveles de expresión temporal del gen fortilin mostrarón una tendencia creciente hacia las 09 y 12 horas post inducción con lipopolisacáridos de *E. coli*, recuperando su nivel básico hacia las 24 y 48 horas.
- La expresión temporal del gen fortilin inducida con LPS de *E. coli* se relacionó significativamente ($P < 0.05$) con la función inmune de *Litopenaeus vannamei*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, R.S. (1996). Production of reactive oxygen intermediates by invertebrate hemocytes: immunological significance in: Soderhall, K. Iwanaga, S; Vasta, G. R (eds.). New Directions in Invertebrate Immunology. Fair Haven, SOS Publication. pp. 109-129. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.
- Bacheré, E.; Gueguen, Y.; Gonzalez, M.; De Lorgeril, J and Romestand, B. (2004). Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunological Reviews, 198: 149-168. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.
- Bangrak, P. Graidist, P. Chotigeat, W and Phongdara, A. (2004). *Molecular cloning and expression of a mammalian homologue of a translationally controlled tumor protein (TCTP) gene from Penaeus monodon shrimp*. Journal of Biotechnology 108 (2004) 219–226. Thailand: Edit. Elsevier
- Barraco, M. y Perazzolo, L. (2008). *Inmunología del camarón*. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei, pp 169-211.
- Bauchau, R. (1981). Crustaceans. In: RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F. (eds.) Invertebrate Blood Cells. v. 2. Academic Press Inc. pp. 385-420. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Bogdan, C.; Rölinghoff, M and Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current opinion in immunology*, 12: 64-76. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Bommer, U. and Thiele, B. (2004). *Molecules in focus the translationally controlled tumour protein (TCTP)*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 379–385. Berlin, Germany: Edit. ELVIER.Ltd.

Bulet P.; Stöcklin, R and Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198: 169-184. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei

Cerenius, L.; Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198: 116-126. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Dalmo, R.A., Martinsen, B; Horsberg, T.E; Ramstad, A; Syvertsen, C; Seljelid, R and Ingebrigtsen, K. (1998). *Prophylactic effect of $\beta(1,3)$ -D-glucan (laminaran) against experimental Aeromonas salmonicida and Vibrio salmonicida infections*. *Journal of Fish Diseases* 21:459-462.

Fagutao, F; Yasuike, M; Marlowe, C; Kondo, H; Hirono, I; Takashi, Y and Takashi, A. (2008). *Gene expression profile of hemocytes of Kuruma*

shrimp, Marsupenaeus japonicus following peptidoglycan stimulation.
Mar Biotechnol .pp 731-40. New York.

FAO. Fishery and Aquaculture Statistics (2009). *Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2009/Estadísticas de pesca y acuicultura 2009*. Roma: FAO; 2011. ISSN 2070-6057. (FAO yearbook; Statistics and Information Service of the Fisheries and Aquaculture Department/Service des statistiques et de l'information du Département des pêches et de l'aquaculture/ Servicio de Estadísticas e Información del Departamento de Pesca y Acuicultura).

FAO. (2012). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012* Roma.

Fire, A.; Xu; S. Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E and Mello, C. C. (1998). Genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Flegel, T. W. (2007). Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Developmental and Comparative Immunology*, 31: 217-231. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Gachet, Y; Tournier, S; Lee, M; Lazaris-Karatzas, A; Poolton, T and Bommer, U.A. (1999). *The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle*. *Journal of Cell Science*, 112, 1257–1271.

Gnanasekar, M., Rao, K.V., Chen, L., Narayanan, R.B., Geetha, M., Scott, A.L., Ramaswamy, K and Kaliraj, P. (2002). *Molecular characterization of a calcium binding translationally controlled tumour protein homologue from the filarial parasites Brugia malayi and Wuchereria bancrofti*. Molecular and Biochemical Parasitology, 121, 107–118.

Graidist P., Fujise K., Wana W., Sritunyalucksana K. and Phongdara A. (2006). Establishing a role for shrimp fortilin in preventing cell death. Aquaculture 255,157-164. En Rajesh, S; Kiruthiga, C; Rashika, V; Priya, R; Narayanan, R. (2009). Molecular cloning, sequence analysis and tissue expression of translationally controlled tumour protein from the WSSV-infected Indian shrimp *Penaeus indicus*. Aquaculture Research, 41, 545-551.

Graidist, P., Phongdara, A., Fujise, K., 2004. Antiapoptotic protein partners fortilin and MCL1 independently protect cells from 5- fluorouracil-induced cytotoxicity. J. Biol. Chem. 279, 40868–40875.

Gross, P. S.; Bartlett, T. C.; Browdy, C. L.; Chapman, R. Wand Warr, G. W. (2001). Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. Developmental and Comparative Immunology, 25: 565-577. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Hannon, G. J. (2002). RNA interference. Nature, 418: 244-251. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

- He, N.; Qin, Q. and Xu, X. (2005). Differential profile of genes expressed in hemocytes of White spot syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Research*, 66: 39-45. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.
- Hergenhahn, H. G.; Hall, M. and Söderhäll, K. (1988). Purification and characterization of an alpha2-macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *The Biochemical Journal*, 255: 801-806. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.
- Hose, J. E.; Martin, G. and Gerard, A. (1990). Decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biological Bulletin*, 178: 33-45. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.
- Jiravanichpaisal, P.; Lee, B. and Söderhäll, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211: 213-236. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.
- Johansson, M. W.; Keyser, P.; Sritunyalucksana, K. and Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191: 45-52. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

- Kröncke, K.D.; Fehse, K. and Kolb-Bachofen, V. (1997). Nitric Oxide: cytotoxicity versus cytoprotection how, why, when, and where? Nitric oxide. 1: 107-120.
- Le Moullac, G., de Laborie, L.P; Saulnier, D; Goarant, C. and Dehasque, M (1998). *Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp*. Páginas 1-12 in R.C. Cerecedo, B.M. Claudia J. Perez Estrada, L. E. Cruz Suarez and D. Ricque Marie (editores), *Avances de Nutrición Acuicola. Memorias del IV Simposium International de Nutrition Acuicola*, La Paz, B.S.C., México.
- Lee, J., Rho, S., Park, S. and Chun, T. (2008). Interaction between fortilin and transforming growth factor-beta stimulated clone-22 (TSC-22) prevents apoptosis via the destabilization of TSC-22. *FEBS Lett*, 582(8), 1210-1218.
- Lee, S. and Söderhäll, K. (2002). *Early events in crustacean innate immunity. Fish Shellfish Immunol*; 12:421–37.
- Li, F., Zhang, D., and Fujise, K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 47542–47549. En Graidist, P., Phongdara, A. and Fujise, K. (2004). Antiapoptotic protein partners fortilin and MCL1 independently protect cells from 5-fluorouracil-induced cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 279, 40868–40875.
- Liu, Z; Xia, L; Wu, Y; Xia, Q; Chen, J. and Roux, K. (2009). Identification and characterization of an arginine kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;150(1):8-14.

- Liu YC, Li FH, Dong B, Wang B, Luan W, Zhang XJ, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Immunol* 2007;44:598– 607. En Prapavorarat, A; Pongsomboon, S and Tassanakajon, A. (2010). Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology* 34. 611–617
- Lorand, L and Conrad, S.M. (1984). Transglutaminases. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 58: 9-35. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.
- Luo T, Zhang X, Shao Z and Xu X. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Lett* 2003; 551: 53–7. En Prapavorarat, A; Pongsomboon, S and Tassanakajon, A. (2010). Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology* 34. 611–617.
- Ma TH, Benzie JA, He JG and Chan SM. PmLT, a C-type lectin specific to hepatopáncreas is involved in the innate defense of the shrimp *Penaeus monodon*. *J Invertebr Pathol* 2008;99: 332–41. En Prapavorarat, A; Pongsomboon, S and Tassanakajon, A. (2010). Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology* 34. 611–617.
- Martin, G. G.; Hose, J. E.; Omori, S.; Chong, C.; Hoodbhoy, T and Mackrell, N. (1991). Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comparative*

Biochemistry and Physiology, 100: 517- 522. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Martin, G. G.; Hose, J. E and Rosenberg, S. (1996). Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis* (Crustacea: Decapoda): Role of hematopoietic tissue. Journal of Morphology, 227: 227-233.

Medzhitov, Rand Janeway, C. A. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell, 91: 295-298. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Murphy, M. P.; Packer, M. A.; Scarlett, J and Martin, S. W. (1998). Peroxynitrite: A Biologically Significant Oxidant. General Pharmacology, 31: 179-186. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Muta, T and Iwanaga, S. (1996). The role of hemolymph coagulation in innate immunity. Current Opinion in Immunology, 8: 41-47. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei

Nappi, A. J and Vass, E. (1993). Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. Pigment Cell Research, 6: 117-126. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Nappi, A. Jand Ottaviani, E. (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioassays*, 22: 469-480. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Nielsen, H. V., Johnsen, A. H., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. Fand Schiotz, P. O. (1998). *Identification of a basophil leukocyte interleukin-3-regulated protein that is identical to IgE-dependent histamine-releasing factor*. *Allergy*. pp. 53, 642–652.

Nupan, B; Phongdara, A; Saengsakda, M; Leu, J and Nupan, Ch. (2011). Shrimp Pm-fortilin inhibits the expression of early and late genes of white spot syndrome virus (WSSV) in an insect cell model. *Developmental and Comparative Immunology* 35 (2011) 469–475

Oikawa K, Ohbayashi T, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Teshima S, Rokutan K, Mukaiand Kuroda M. (2002). *Dioxin stimulates synthesis and secretion of IgE-dependent histamine-releasing factor*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290, 984–987.

Pfaffl, M; Horgan, G.Wand Dempfle, L. (2002). *Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Institute of Physiology, FML-Weißenstephan, Center of Life and Food Sciences, Technical University of Munich, Germany, Biomathematics and Statistics Scotland, Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen AB21 9SB, UK and Department of Animal Science, Center of Life and Food Sciences, Technical University of Munich, Germany. Oxford University Press. *Nucleic Acids Research*, 2002, Vol. 30, No. 9 e36.

Prapavorarat, A; Pongsomboon, S; and Tassanakajon, A. (2010). Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression

subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology* 34. 611–617

PRODUCE. (2007). Situación actual de la acuicultura en el Perú: análisis del sistema productivo de langostinos.

PROMPERÚ. (2012). Informe anual 2011. Desarrollo del comercio exterior pesquero.

Rao, K.; Chen, L; Gnanasekar, Mand Ramaswamy, K. (2002). *Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 31207–31213.

Raa, J. (2000). *The use the immune-stimulants in fish and shellfish feeds*. In: Cruz- Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 19-22 Noviembre. Mérida-Yucatán, México.

Rajesh, S.; Kiruthiga, C.; Rashika, V.; Priya, R and Narayanan, RB. (2010). Molecular cloning, sequence analysis and tissue expression of translationally controlled tumor protein from WSSV-infected indian shrimp *Penaeus indicus*. Centre for biotechnology, Anna University. India.

Reddy, K. V.; Yeredy, R. D and Aranha, C.(2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24: 536-547. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e*

inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Robalino, J.; Bartlett, T. C.; Chapman, R. W.; Gross, P. S.; Browdy, C. LandWarr, G. W. (2007). Doublestranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. *Developmental and Comparative Immunology*, 31: 539-547. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Roch, P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrate. *Aquaculture*, 172, 125-145. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Roulston, A.; Marcellus, R. Cand Branton, P.E. (1999). Viruses and apoptosis. *Annual Review of Microbiology*, 53: 577-628. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. Vand Mann, M. (2007). *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nature protocols*.pp: 2856-2860.

Söderhäll, K. and Cerenius, L. (1992). *Crustacean immunity. Annual Review of Fish Diseases*.pp.3-23.

Söderhäll, K. and Smith, V. (1983). *Separation of the haemocyte populations of Carcinus maenas and other marine decapods, and*

prophenoloxidase distribution. Developmental and Comparative Immunology. pp. 7:229-239.

Somboonwiwat, K; Chaikerasitak, V; Wang, H; Lo, C and Tassanakajon, A. (2010). *Proteomic analysis of differentially expressed proteins in Penaeus monodon hemocytes after Vibrio harveyi infection*. *Proteome Sci*. pp. 8:39.

Stürzenbaum, S., Kille, P and Morgan, A. (1998). Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumor protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Biochem. Biophys. Acta* **1398**: 294-304. En Wang, Q; Fang, D; Li, W; Wang, J And Jiang, H. (2011). A Novel TCTP Gene From the Crustacean *Eriocheir sinensis*: Possible Role Involving Metallic Cu²⁺ Stress. Reference: *Biol. Bull.* 221: 290-299.

Supungul, P.; Klinbunga, S.; Pichyangkura, R.; Jitrapakdee, S.; Hirono, I.; Aoki, T and Tassanakajon, A. (2002). Identification of immune-related gene in hemocytes of black tiger shrimp *monodon*). *Marine Biotechnology*, 4: 487-494. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Susini, L.; Besse, S.; Duflaut, A.; Lespagnol, A.; Beekman, C.; Fiucci, G.; Atkinson, AR.; Busso, D.; Poussin, P.; Marine, JC.; Martinou, JC.; Cavarelli, J.; Moras, D.; Amson, R and Telerman, A. (2008). TCTP protege de la muerte celular apoptótica antagonizando función bax. *Nature Publishing Group All rights reserved 1350-9047/08*. pp. 1211-1220.

Theopold, U.; Schmidt, O.; Söderhäll, K and Dushay, M. (2004). Coagulation in arthropods: defense, wound closure and healing. *Trends in*

Immunology, 25: 378-388. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

Teshima, S., Rokutan, K., Nikawa, T. and Kishi, K. (1998). *Macrophage colony-stimulating factor stimulates synthesis and secretion of a mouse homolog of a human IgE-dependent histamine-releasing factor by macrophages in vitro and in vivo*. Journal of Immunology, 161, 6356–6366.

Thaw, P., Baxter, N. J., Hounslow, A. M., Price, C., Waltho, J. P., and Craven, C. J. (2001). *Nat. Struct. Biol.* 8, 701–704. En Graidist, P., Phongdara, A. and Fujise, K., (2004). Antiapoptotic protein partners fortilin and MCL1 independently protect cells from 5- fluorouracil-induced cytotoxicity. J. Biol. Chem. 279, 40868–40875.

Thiele, H., Berger, M., Lenzner, C., Kuhn, H., and Thiele, B. J. (1998). *Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP) P23*. European Journal of Biochemistry, 257, 62–68.

Tonganunt, M., Nupan, B., Saengsakda, M., Suklour, S., Wanna, W., Senapin, S., Chotigeat, W., and Phongdara, A. (2008). The role of Pm-fortilin in protecting shrimp from white spot syndrome virus (WSSV) infection. Fish Shellfish Immunol. 25, 633–637. En Li, F., Zhang, D., Fujise, K., (2001). Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. J. Biol. Chem. 276 (50), 47542–47549.

Toke, O. antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. Biopolymers, 80: 717-735. En Morales V, Cuéllar J, editores. Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.

- Wang L, Zhi B, Wu Wand Zhang X. Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection. *Dev Comp Immunol* 2008;32:706–15. En Prapavorarat, A; Pongsomboon, Sand Tassanakajon, A. (2010). Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology* 34. 611–617.
- Warner, H. R. (1994). Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 3: 249-258. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.
- Wongprasert, K.; Khanobdee, K.; Glunukarn, S. S.; Meeratana, P.; and withyachumnarnkul, B. (2003). Time-course and levels of apoptose in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55: 3 10. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.
- Wu, J. L.; and Muroga, K. (2004). Apoptose does not play an important role in the resistance of 'immune' *Penaeus japonicus* against white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 27: 15-21. En Morales V, Cuéllar J, editores. *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei.
- Xu, A; Bellany, A.R; Taylor, J.A. (1999). *Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level*. *Biochemical Journal*, 342, 683–689.

Yépez, V. (2002). *Estado situacional de la maricultura en la costa peruana. Dirección de investigaciones en acuicultura. Gestión costera y aguas continentales.* Instituto del Mar del Perú (IMARPE). De: http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/acuic_esta_sit_maric_ult.pdf).

Yubero, N; Estesio, G; Cardona, H; Morera, L; Garrido, J and Barbancho, M. (2009). Molecular cloning, expression analysis and chromosome localization of the Tpt1 gene coding for the pig translationally controlled tumor protein (TCTP). *Mol Biol Rep* (2009) 36:1957–1965.

Zhang X, Huang C, and Qin Q. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antiviral Res* 2004;61: 93–9. En Prapavorarat, A; Pongsomboon, S; and Tassanakajon, A. (2010). Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology* 34. 611–617.

Zhao ZY, Yin ZX, Xu XP, Weng SP, Rao XY, Dai ZX, et al. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J Virol* 2009;83: 347–56. En Prapavorarat, A; Pongsomboon, S; and Tassanakajon, A. (2010). Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology* 34. 611–617.

ANEXOS

1. CONDICIONES AMBIENTALES MANTENIDAS CONSTANTES EN LOS TRES GRUPOS DE TRABAJO.

T°	23±1°C
Ph	7.6±0.05
Salinidad	32 ±1 ppm
[O ₂]	5±1 mg/l

2. TRATAMIENTO CON DNase I FERMENTAS® A MUESTRAS DE ARN

Para la degradación de ADN de las muestras de ARN se prosigue de la siguiente manera:

1.1 Agregar a cada tubo de reacción:

ARN	1 ug. (11 uL)
Buffer de reacción con MgCl ₂	1 uL
DNase I, RNase free	1 uL (1 u)
Agua tratada con DEPC	Hasta 15 uL

2.2 Incubar a 37°C por 30 min.

2.3 Agregar 1 uL de EDTA 50 mM e incubar a 65°C por 10 min.

3. SECUENCIAS DE PRIMERS USADOS EN LA INVESTIGACIÓN

Códigos

F4-FF4: primer FORWARD específico para Fortilin

F4-FR4: primer REVERSE específico para Fortilin

Características de Primers

OLIGO	SEQUENCE (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
F4-FF4	GCGTCTGCAAGAAACCGG	Plus	18	216	233	59.44	61.11%
F4-FR4	CCATCAGGGTCCATTGATTCA	Minus	21	413	393	57.70	47.62%
Product length	198						

4. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA CONSENSO POR BLAST (NCBI)

TCGGTCTGCAAGAAACCGGCTTCCAAGTCAAGAAGGATTATCTT
 GCTTACATGAAAGAATATCTAAAGAATGTAAAGGCAAAGTTGGA
 AGGCACACCTGAAGCTTCAAAGTTAACATCTATCCAGAAGCCTC
 TGACAGACCTTTTGAAGAAGTTCAAGGACTTGCAATTCTTCACT
 GGTGAATCAATGGACCCTGATG-----

-----198

Litopenaeus vannamei translationally controlled tumor protein mRNA, complete cds							
Sequence ID: gb EU305625.1 Length: 507 Number of Matches: 2							
Range 1: 285 to 413			GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
239 bits(129)	3e-59	129/129(100%)	0/129(0%)	Plus/Plus			
Query 518	TGTAAAGGCAAGTTGGAGGCACACCTGAAGCTTCAAAGTTAACATCTATCCAGAGCC	577					
Sbjct 285	TGTAAAGGCAAGTTGGAGGCACACCTGAAGCTTCAAAGTTAACATCTATCCAGAGCC	344					
Query 578	TCTGACAGACCTTTTGAAGAAGTTCAAGGACTTGCAATTCTTCACTGGTGAATCAATGGA	637					
Sbjct 345	TCTGACAGACCTTTTGAAGAAGTTCAAGGACTTGCAATTCTTCACTGGTGAATCAATGGA	404					
Query 638	CCCTGATGG	646					
Sbjct 405	CCCTGATGG	413					
Range 2: 216 to 289			GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
126 bits(68)	2e-25	72/74(97%)	1/74(1%)	Plus/Plus			
Query 1	GCGTCTGCAAGAAACCGGCTTCCAAGTYAAGAAGGATTATCTTGCTTACATGAAAGAATA	60					
Sbjct 216	GCGTCTGCAAGAAACCGGCTTCCAAGTCAAGAAGGATTATCTTGCTTACATGAAAGAATA	275					
Query 61	ICTAAAGAA-GTAA	73					
Sbjct 276	ICTAAAGAATGTAA	289					

Figura 5: Comparación de la secuencia consenso con la base de datos

GeneBank

5. EXPRESIONES INDIVIDUALES DE *Litopenaeus vannamei* DEL GEN FORTILIN POR REAL TIME-PCR

TABLA 5: Expresión sin inyección de Fortilin en función del tiempo

Fortilin sin inducción			
Muestra	Cp	Tm	Promedio Cp
SI 3H001	34.71	84.77	27.99
SI 3H002	31.34	82.21	
SI 3H003			
SI 3H004	23.68	82.03	
SI 3H005	28.94	82.16	
SI 6H001	33.13	82.08	32.7
SI 6H002	32.08	81.97	
SI 6H003	33.84	82.18	
SI 6H004	30.98	82.02	
SI 6H005	33.46	81.97	
SI 9H001	32.1	81.82	34.6
SI 9H002			
SI 9H003	36.94	81.6	
SI 9H004	34.76	81.63	
SI 9H005	36.52	80.75	
SI 12H001	38.05	81.57	35.95
SI 12H002			
SI 12H003	33.14	81.92	
SI 12H004	36.65	81.75	
SI 12H005			
SI 24H001	35.75	82.68	34.32
SI 24H002			
SI 24H003	33.72	81.63	
SI 24H004	30.88	82.17	
SI 24H005	36.91	81.62	
SI 48H001	34.51	82.91	35.22
SI 48H002	34.9	82.21	
SI 48H003	39.34	82.54	
SI 48H004	33.07	81.47	
SI 48H005	34.49	81.96	

Los valores de color rojo, son valores de Cp discriminados por los valores de la temperatura de Melting (Tm)

TABLA 6: Expresión con Solución Salina de fortilin en función del tiempo

Fortilin-solución salina			
Muestra	Cp	Tm	Promedio Cp
SSS 3H 1	40	84.14	35.97
SSS 3H 2			
SSS 3H 3	40	84.27	
SSS 3H 4	35.97	81.1	
SSS 3H 5			
SSS 6H 1	40	84.15	37.74
SSS 6H 2	37.74	82.44	
SSS 6H 3			
SSS 6H 4	40	81.29	
SSS 6H 5	40	83.58	
SSS 9H 1	36.03	82.42	36.84
SSS 9H 2			
SSS 9H 3	37.65	82.25	
SSS 9H 4	36.09	80.89	
SSS 9H 5	31.7	80.92	
SSS 12H 1	40	61.75	36.55
SSS 12H 2	37.11	82.63	
SSS 12H 3	33.6	79.38	
SSS 12H 4			
SSS 12H 5	35.98	82.82	
SSS 24H 1	35.8	82.35	34.14
SSS 24H 2	35.08	81.99	
SSS 24H 3	32.72	82.05	
SSS 24H 4	32.94	82.07	
SSS 24H 5	36.85	80.92	
SSS 48H 1	36.04	82.63	35.67
SSS 48H 2	35.43	82.5	
SSS 48H 3	35.65	82.36	
SSS 48H 4	35.75	82.41	
SSS 48H 5	35.49	82.28	

Los valores de color rojo, son valores de Cp discriminados por los valores de la temperatura de Melting (Tm).

TABLA 7: Expresión con inducción de LPS de *E. coli* de fortilin en función del tiempo

Fortilin-LPS			
Muestra	Cp	Tm	Promedio Cp
LPS 3H 1	40	62	35.42
LPS 3H 2			
LPS 3H 3	37.12	79.54	
LPS 3H 4			
LPS 3H 5	35.42	80.99	
LPS 6H 1	24.32	83.05	32.65
LPS 6H 2	36.92	82.3	
LPS 6H 3	33.77	82.16	
LPS 6H 4	23.27	82.28	
LPS 6H 5	36.64	81.79	
LPS 9H 1	36.85	82.6	24.87
LPS 9H 2	38.08	83.25	
LPS 9H 3	19.44	82.28	
LPS 9H 4	30.33	83.09	
LPS 9H 5	18.32	81.95	
LPS 12H 1	31.59	82.05	33.13
LPS 12H 2	34.1	82.06	
LPS 12H 3	26.84	81.65	
LPS 12H 4	40	80.96	
LPS 12H 5	40	82.73	
LPS 24H 1	30.97	82.23	34.24
LPS 24H 2	35.42	82.17	
LPS 24H 3	36.91	81.76	
LPS 24H 4			
LPS 24H 5	33.64	81.99	
LPS 48H 1			33.92
LPS 48H 2	32.81	81.42	
LPS 48H 3	40	81.97	
LPS 48H 4			
LPS 48H 5	28.94	82.24	

Los valores de color rojo, son valores de Cp discriminados por los valores de la temperatura de Melting (Tm).

TABLA 8: Expresión de EFA sin inyección en función del tiempo

EFA-sin inducción			
Muestra	Cp	Tm	Promedio Cp
SI 3H001	30.25	83.4	29.5
SI 3H002	29.68	83.48	
SI 3H003			
SI 3H004	27.58	83.1	
SI 3H005	30.48	83.46	
SI 6H001	29.53	83.48	29.67
SI 6H002	28.79	83.48	
SI 6H003	28.79	77.72	
SI 6H004	30.46	83.44	
SI 6H005	29.88	83.21	
SI 9H001	29.84	83.29	28.98
SI 9H002			
SI 9H003	29.35	83.93	
SI 9H004	29.26	84.3	
SI 9H005	27.74	83.96	
SI 12H001	32.09	78.03	28.99
SI 12H002			
SI 12H003	29.9	83.41	
SI 12H004	28.08	84.01	
SI 12H005			
SI 24H001	30.03	83.75	29.67
SI 24H002			
SI 24H003	30.04	84.14	
SI 24H004	29.71	84.2	
SI 24H005	28.9	83.53	
SI 48H001	30.96	83.4	31.04
SI 48H002	30.43	83.45	
SI 48H003	31.02	83.53	
SI 48H004	32.36	78.33	
SI 48H005	31.73	83.48	

Los valores de color rojo, son valores de Cp discriminados por los valores de la temperatura de Melting (Tm).

TABLA 9: Expresión de EFA bajo Solución Salina en función del tiempo

EFA-solución salina			
Muestra	Cp	Tm	Promedio Cp
SSS 3H 1	37	78.64	28.82
SSS 3H 2	40	76.85	
SSS 3H 3	29.32	83.91	
SSS 3H 4	28.32	83.47	
SSS 3H 5			
SSS 6H 1	29.46	83.48	32.49
SSS 6H 2	34.86	78.77	
SSS 6H 3	33.84	83.31	
SSS 6H 4	35.49	83.48	
SSS 6H 5	31.18	83	
SSS 9H 1	32.71	83.12	31.64
SSS 9H 2	32.55	83.05	
SSS 9H 3	31.36	83.13	
SSS 9H 4	31.05	83.27	
SSS 9H 5	30.51	83.14	
SSS 12H 1	30.95	83.41	31.7
SSS 12H 2	31.6	83.07	
SSS 12H 3	32.56	83.03	
SSS 12H 4			
SSS 12H 5	31.71	78.4	
SSS 24H 1	32.28	83.03	30.94
SSS 24H 2	32.08	83.01	
SSS 24H 3	30.49	82.86	
SSS 24H 4	29.66	82.83	
SSS 24H 5	30.2	83.49	
SSS 48H 1	30.1	82.89	30.48
SSS 48H 2	30.84	82.81	
SSS 48H 3	30.62	82.9	
SSS 48H 4	30.01	82.97	
SSS 48H 5	30.85	82.86	

Los valores de color rojo, son valores de Cp discriminados por los valores de la temperatura de Melting (Tm).

TABLA 10: Expresión de EFA bajo inducción con LPS en función del tiempo

EFA-LPS			
Muestra	Cp	Tm	Promedio Cp
LPS 3H 1	32.5	83.43	31.05
LPS 3H 2	31.2	83.56	
LPS 3H 3	31.18	83.35	
LPS 3H 4	40	83.82	
LPS 3H 5	30.78	83.38	
LPS 6H 1	30.36	83.26	31.65
LPS 6H 2	32.05	82.29	
LPS 6H 3	31.45	83.07	
LPS 6H 4	28.96	83.03	
LPS 6H 5	32.73	83.78	
LPS 9H 1	31.53	83.05	25.98
LPS 9H 2	29.86	83.12	
LPS 9H 3	20.32	83.14	
LPS 9H 4	31.47	83.17	
LPS 9H 5	20.6	83.06	
LPS 12H 1	33	77.3	32.67
LPS 12H 2	32.52	83.02	
LPS 12H 3	34.23	83.13	
LPS 12H 4	31.66	77.87	
LPS 12H 5	31.25	83.25	
LPS 24H 1	29.95	83.32	30.69
LPS 24H 2	33.01	83.08	
LPS 24H 3	35.4	78.97	
LPS 24H 4	31.63	84.13	
LPS 24H 5	29.12	83.28	
LPS 48H 1	29.53	83.32	31.25
LPS 48H 2	37.29	79.69	
LPS 48H 3	29.61	83.25	
LPS 48H 4			
LPS 48H 5	34.6	82.91	

Los valores de color rojo, son valores de Cp discriminados por los valores de la temperatura de Melting (Tm).

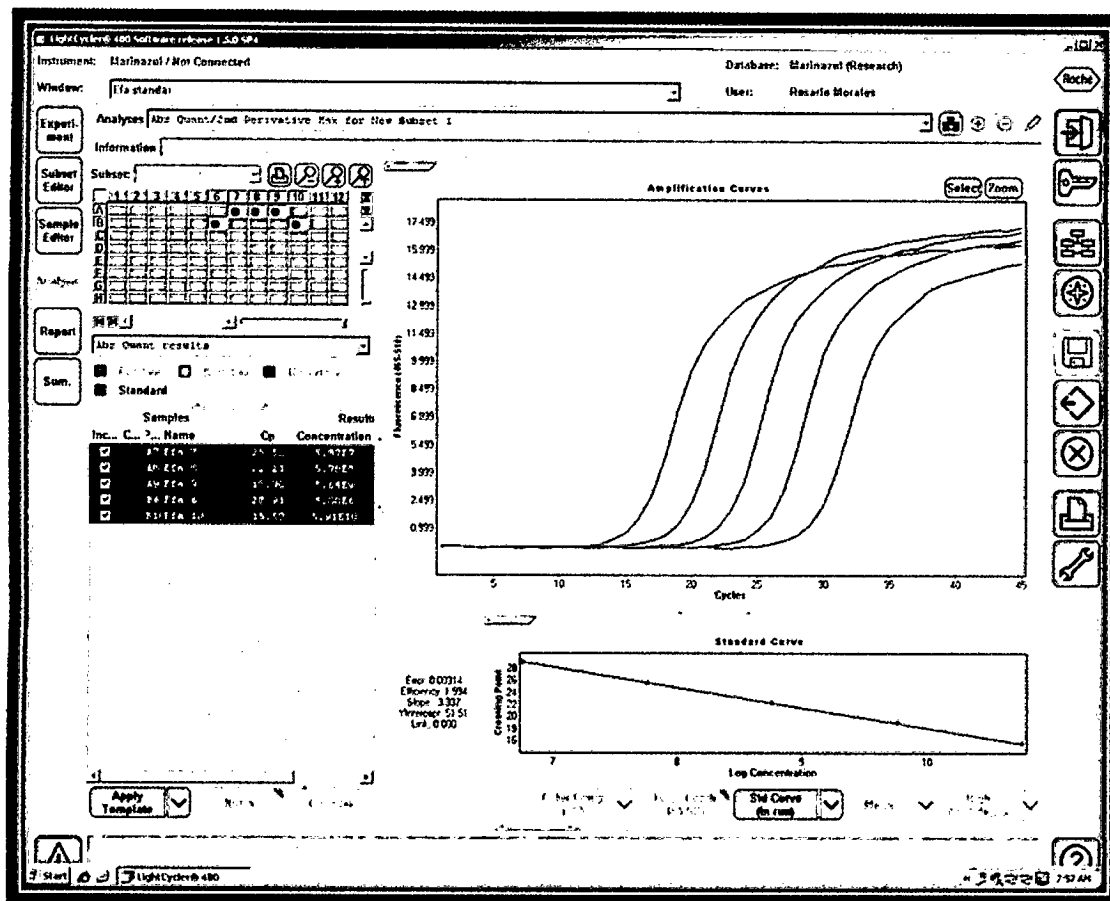


Figura6: Curva estándar de EFA (gen de referencia)

TABLA 11: Concentraciones logarítmicas de EFA empleadas para calibración de la curva estándar

MUESTRA	CONCENTRACIÓN
EFA 6	$5.80 \cdot 10^{-6}$
EFA 7	$5.87 \cdot 10^{-7}$
EFA 8	$5.78 \cdot 10^{-8}$
EFA 9	$5.6 \cdot 10^{-9}$
EFA 10	$5.9 \cdot 10^{-10}$

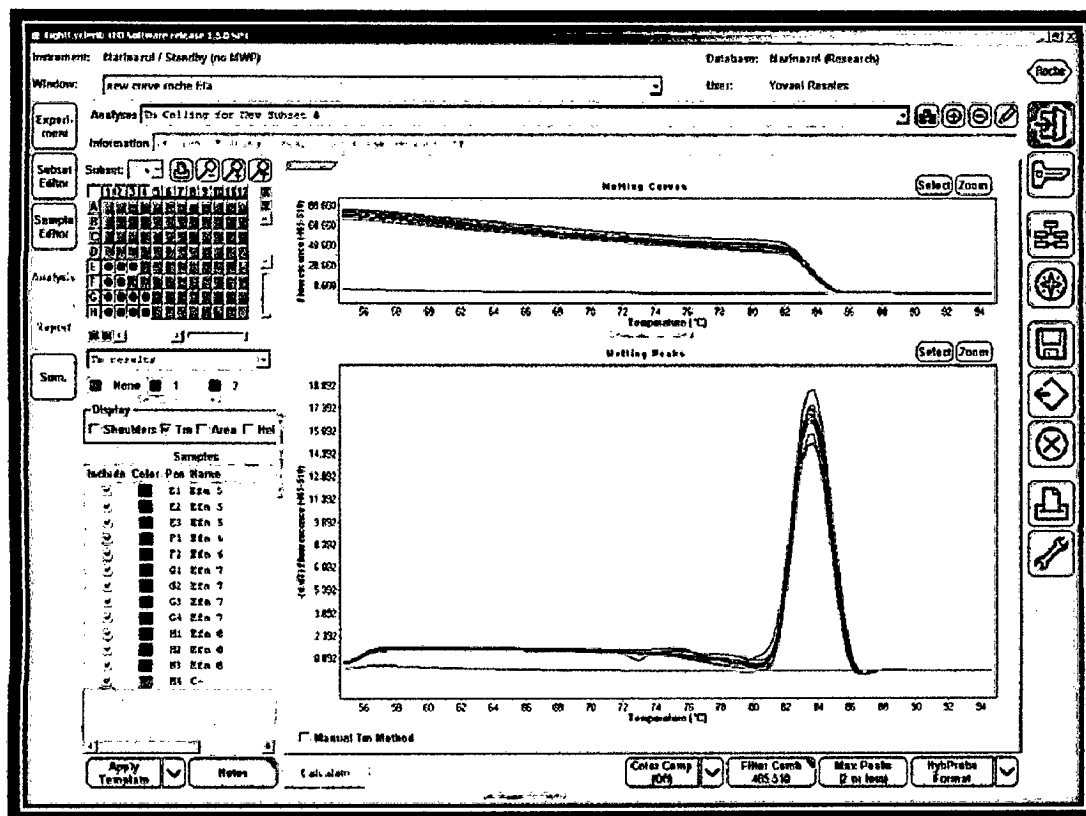


Figura 7: Curva de melting de los productos de EFA

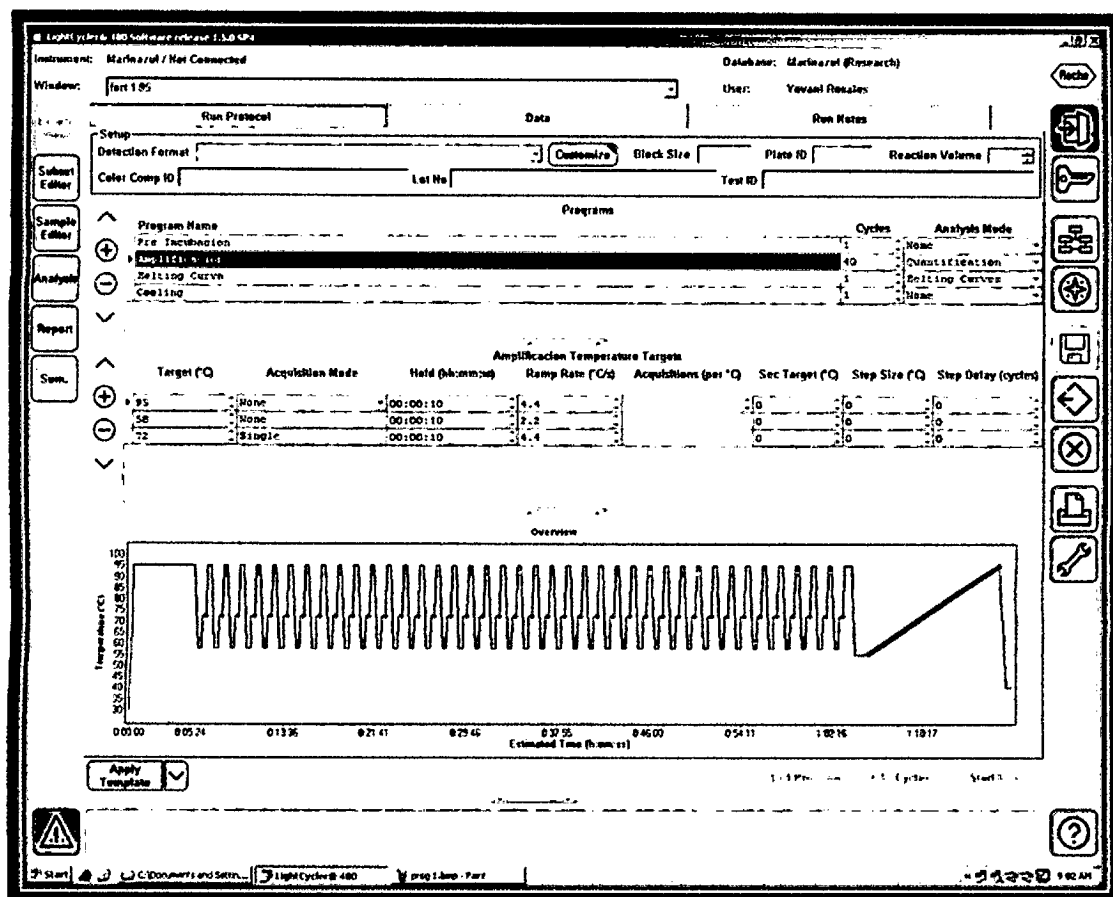


Figura8: Programa de amplificación LightCycler 480

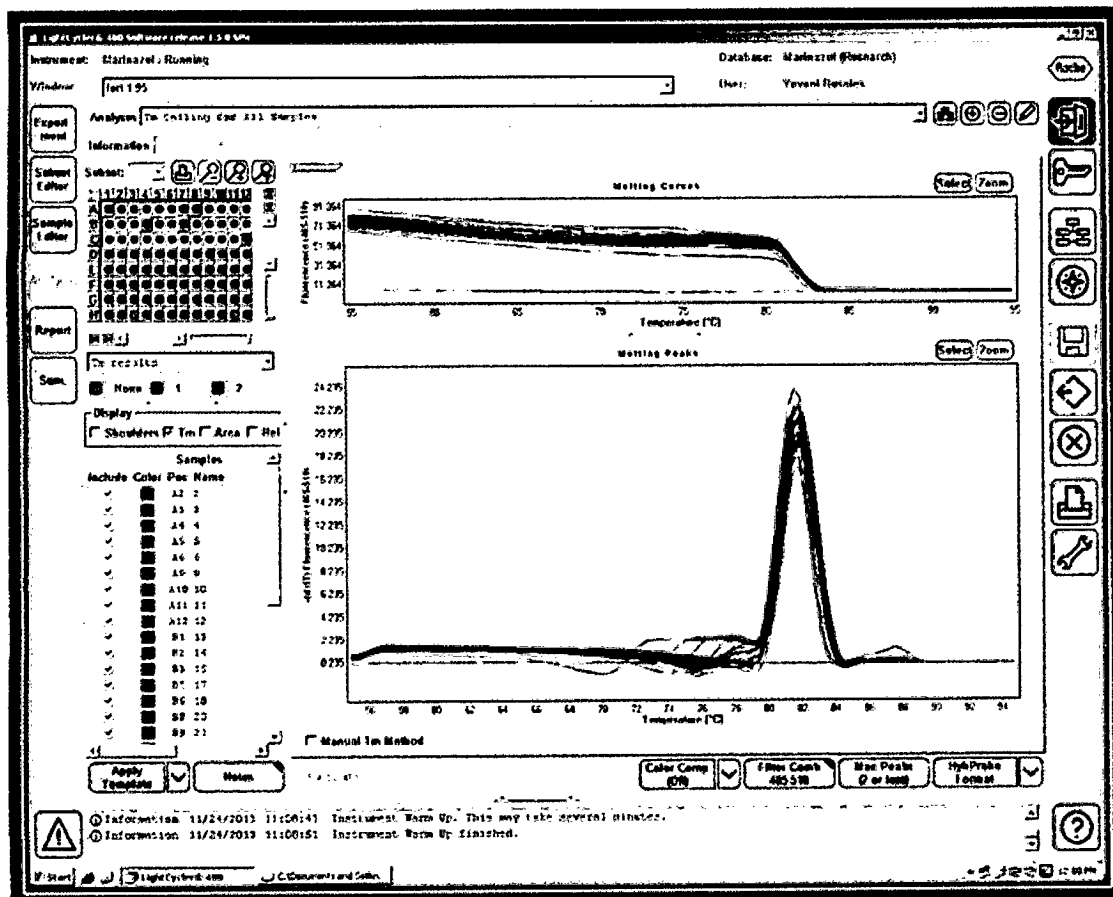


Figura 9: Curva de melting de los productos de fortilin

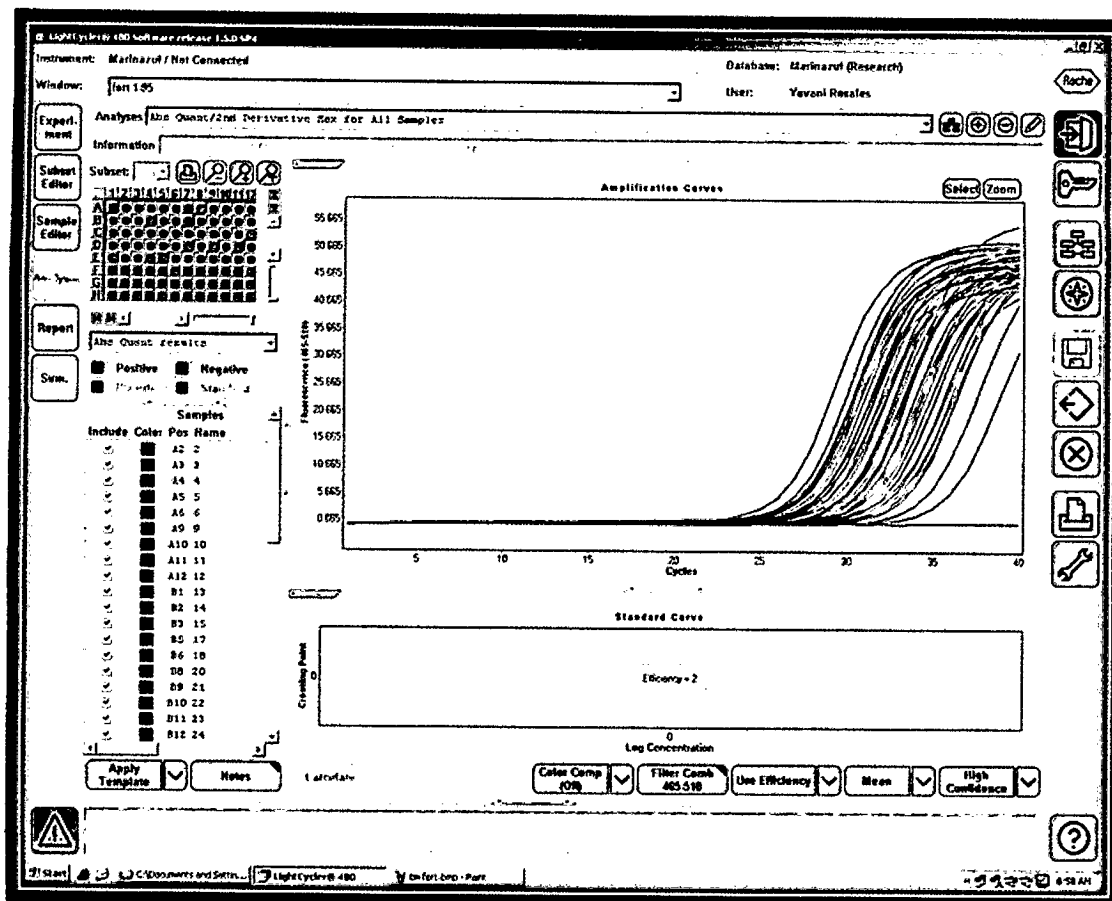


Figura 10: Curvas de amplificación de productos de fortilin por qPCR

TABLA12: Niveles de expresión en los diferentes tratamientos medidos en el número de veces el control

T	Tiempo	Cp control Fortilin	Cp muestra Fortilin	Cp control EFA	Cp muestra EFA	ΔC_p Fortilin	ΔC_p EFA	$(E_{Fortilin})^{\Delta C_p}$	$(E_{EFA})^{\Delta C_p}$	Razón de la expresión
SI/LPS	03hrs	27,99	35,42	29,50	31,05	-7,43	-1,56	0,006	0,368	0,016
	06hrs	32,70	32,65	29,67	31,65	0,05	-1,98	1,034	0,280	3,690
	09hrs	34,60	24,87	28,98	25,98	9,73	3,00	849,223	6,844	124,077
	12hrs	35,95	33,13	28,99	32,67	2,81	-3,68	7,033	0,094	74,479
	24hrs	34,32	34,24	29,67	30,69	0,08	-1,02	7,033	0,518	13,565
	48hrs	35,26	33,92	31,04	31,25	1,35	-0,21	2,541	0,873	2,911
SSS/LPS	03hrs	35,97	35,42	28,82	31,05	0,55	-2,23	1,464	0,238	6,139
	06hrs	37,74	32,65	32,49	31,65	5,09	0,84	34,060	1,720	19,801
	09hrs	36,84	24,87	31,64	25,98	11,97	5,66	4011,706	37,725	106,340
	12hrs	36,55	33,13	31,70	32,67	3,41	-0,96	10,648	0,539	19,760
	24hrs	34,14	34,24	30,94	30,69	-0,10	0,25	0,933	1,173	0,795
	48hrs	35,67	33,92	30,48	31,25	1,76	-0,76	3,376	0,613	5,508
SI/SSS	03hrs	27,99	35,97	29,50	28,82	-7,98	0,68	0,004	1,545	0,003
	06hrs	32,70	37,74	29,67	32,49	-5,04	-2,83	0,030	0,163	0,186
	09hrs	34,60	36,84	28,98	31,64	-2,24	-2,66	0,212	0,181	1,167
	12hrs	35,95	36,55	28,99	31,70	-0,60	-2,71	0,661	0,175	3,769
	24hrs	34,32	34,14	29,67	30,94	0,18	-1,27	1,133	0,442	2,563
	48hrs	35,26	35,67	31,04	30,48	-0,41	0,55	0,753	1,424	0,528

TABLA 13: Análisis de varianza ANOVA de la razón de expresión.

Analysis of Variance for B.RAZON DE EXPRESION - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:B.TIEMPO	19570,7	5	3914,14	12,36	0,0077
B:B.TRATAMIENTO	303,963	1	303,963	0,96	0,3723
RESIDUAL	1583,86	5	316,772		
TOTAL (CORRECTED)	21458,5	11			

Los valores de p prueban la significación estadística de cada uno de los factores. Desde un P-valor es inferior a 0,05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre B.RAZON DE EXPRESION al nivel de confianza 95,0%.

SOLUCIONES

1. SOLUCIÓN SALINA DE LANGOSTINO (0,85% NaCl) (Shevchenko *et al.*, 2007)

SAL	CONCENTRACIÓN (mM)	PESO MOLECULAR (gr/mol)	CANTIDAD (gr/L)
NaCl	400	58.44	23.38
MgSO ₄	23	120.36	2.76
MgCl	20	95.22	1.90
KCl	13	74.55	0.96
CaCl ₂ .2H ₂ O	8.6	147	1.26
NaHCO ₃	3.6	8.4	0.30
Na ₂ HPO ₄	0.37	141.98	0.052
pH	7.4	----	----

2. SOLUCIÓN ANTICOAGULANTE MAS (Modificated Alsever Solution, en (Barraco *et al.*, 2008))

ELEMENTO	CONCENTRACIÓN (mM)	PESO MOLECULAR (gr/mol)	CANTIDAD (gr/0.5L)
Citrato de sodio	27	294.10	3.97
Cloruro de sodio	336	58.44	9.81
Glucosa	115	180.15	10.35
EDTA	9	372.20	1.67
pH	7.0	----	----